

*Università degli Studi del Piemonte Orientale*

*“Amedeo Avogadro”*

*Dipartimento di Scienze Mediche*



*Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare*

*Ciclo XXII (2006-2009)*

**RUOLO DI OSTEOPONTINA NELLA SEPSI E  
NELLO SVILUPPO  
DELLA SINDROME AUTOIMMUNE  
LINFOPROLIFERATIVA**

*Candidato: Elena Boggio*

*Tutor e Relatore: Prof. Umberto Dianzani*

# ***INDICE***

<b>RIASSUNTO</b>	<b>pag. 3</b>
<b>ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI</b>	<b>pag. 7</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>pag. 8</b>
<b>1. LE DIFESE IMMUNITARIE</b>	<b>pag. 8</b>
<b>2. LA SEPSI</b>	<b>pag. 10</b>
2.1 <i>Definizioni</i>	<b>pag. 10</b>
2.2 <i>Eziologia</i>	<b>pag. 11</b>
2.3 <i>Patogenesi</i>	<b>pag. 12</b>
2.4 <i>Terapia</i>	<b>pag. 13</b>
2.5 <i>Risposta immunitaria in corso di sepsi</i>	<b>pag. 14</b>
<b>3. IL SISTEMA IMMUNITARIO E L'APOPTOSI</b>	<b>pag. 15</b>
3.1 <i>Tolleranza centrale e periferica</i>	<b>pag. 15</b>
3.2 <i>Il sistema Fas/Fas Ligando</i>	<b>pag. 16</b>
3.3 <i>L'Activation Induced Cell Death (AICD)</i>	<b>pag. 18</b>
3.4 <i>Le malattie autoimmuni e i difetti apoptotici</i>	<b>pag. 18</b>
3.5 <i>La Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS)</i>	<b>pag. 19</b>
<b>4. OSTEOPONTINA</b>	<b>pag. 23</b>
4.1 <i>Caratteristiche strutturali e funzionali</i>	<b>pag. 23</b>
4.2 <i>Ruolo nell'infiammazione</i>	<b>pag. 24</b>
4.3 <i>Ruolo nei tumori</i>	<b>pag. 25</b>
4.5 <i>Ruolo nelle malattie autoimmuni</i>	<b>pag. 25</b>
<b>5. TIMP-1</b>	<b>pag. 27</b>
5.1 <i>Caratteristiche funzionali</i>	<b>pag. 27</b>
5.2 <i>TIMP-1 e CD63</i>	<b>pag. 28</b>

5.3	<i>TIMP-1 e malattia</i>	<b>pag. 29</b>
	<b>SCOPO GENERALE DELLA TESI</b>	<b>pag. 31</b>
	<b>ARTICOLO I</b>	<b>pag. 32</b>
	<i>Introduzione</i>	<b>pag. 32</b>
	<i>Materiali e Metodi</i>	<b>pag. 34</b>
	<i>Risultati</i>	<b>pag. 38</b>
	<i>Discussione</i>	<b>pag. 45</b>
	<b>ARTICOLO II</b>	<b>pag. 48</b>
	<i>Introduzione</i>	<b>pag. 48</b>
	<i>Materiali e Metodi</i>	<b>pag. 50</b>
	<i>Risultati</i>	<b>pag. 55</b>
	<i>Discussione</i>	<b>pag. 64</b>
	<b>CONCLUSIONI GENERALI DELLA TESI</b>	<b>pag. 67</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>pag. 68</b>

## ***RIASSUNTO***

Osteopontina (OPN) è una glicoproteina acida fosforilata la quale funziona sia da proteina della matrice extra-cellulare sia da citochina nei fluidi biologici, svolgendo un ruolo importante nel favorire lo sviluppo di una risposta immunitaria pro-infiammatoria di tipo-1. È secreta da osteoblasti, osteociti, cellule endoteliali, cellule epiteliali ma anche da macrofagi e da linfociti T attivati ed è presente nei fluidi extra-cellulari, a livello del sito d'infiammazione e a livello della matrice extra-cellulare dei tessuti mineralizzati. OPN interagisce con differenti recettori di superficie, quali integrine e CD44, stimolando la migrazione e l'adesione cellulare.

Studi, sia *in vitro* che *in vivo*, hanno dimostrato che OPN costimola i macrofagi, attivati da lipopolisaccaride (LPS), a produrre Interleuchina (IL)-12 ed inibisce invece, la produzione di IL-10. Essa aumenta quindi, l'espressione delle citochine di tipo T-helper (TH) 1 e inibisce quella delle citochine TH2. In linea con quest'osservazione, topi *knock out* per OPN (OPN<sup>-/-</sup>) rispondono ad infezioni normalmente caratterizzate da una risposta di tipo TH1 con una ridotta produzione di IL-12 e un'augmentata produzione di IL-10. OPN inoltre, svolge un'importante azione nel richiamo precoce di monociti e macrofagi nei tessuti danneggiati da insulti ischemici, infettivi o tossici.

OPN presenta caratteristiche sia pro- che anti-infiammatorie. Per quanto riguarda l'effetto pro-infiammatorio, OPN promuove la chemiotassi dei monociti-macrofagi e stimola il differenziamento in senso TH1; vista la sua capacità di attivazione della chemiotassi nei macrofagi, essa è implicata nella formazione dei granulomi e, infatti è aumentata in alcune malattie granulomatose, tra le quali la sarcoidosi e la tubercolosi. Studi in letteratura hanno descritto il coinvolgimento di OPN in differenti processi infiammatori, quali la malattia di Crohn, la tubercolosi e il Lupus Eritematosus Sistemico (LES).

Per quanto riguarda le funzioni anti-infiammatorie di OPN, è stato dimostrato che, nell'ambito dell'attivazione mediata da LPS, OPN è in grado di ridurre la produzione di ossido nitrico per inibizione dell'ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS). L'inibizione di iNOS nei pazienti con sepsi può interferire con le proprietà battericide dei macrofagi peggiorando il quadro della malattia.

Dal momento che OPN è coinvolta nel reclutamento dei macrofagi nei tessuti danneggiati e nell'infiammazione, in questa tesi è stato valutato il suo coinvolgimento nella sepsi.

La sepsi sembra caratterizzata dalla presenza contemporanea di una risposta pro- ed una risposta anti-infiammatoria definite rispettivamente *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) e *Compensatory Antinflammatory Response Syndrome* (CARS). Sia una risposta infiammatoria eccessiva, sia una risposta anti-infiammatoria con sviluppo di immunoparalisi possono essere considerate la causa della disfunzione d'organo ed eventualmente della morte dei soggetti con sepsi e OPN potrebbe quindi svolgere un ruolo importante in entrambe le fasi.

Con queste premesse, in questa tesi, sono stati valutati i livelli sierici di OPN in pazienti con SIRS e sepsi, per verificare se fosse alterata, ed eventualmente identificare il suo ruolo come *marker* per definire lo stato di malattia.

Nel primo articolo presentato in questa tesi sono descritti i seguenti risultati:

- i) sono stati valutati i livelli sierici di OPN in 29 pazienti con SIRS, 27 pazienti con Sepsis Grave/Shock Settico (SG/SS), 21 pazienti in risoluzione e 56 controlli sani. I risultati ottenuti permettono di dimostrare che i livelli di OPN sono significativamente più elevati nei pazienti rispetto ai controlli sani ( $p < 0.05$ ) e significativamente più elevati nei pazienti con SG/SS rispetto a quelli con SIRS ( $p < 0.001$ ). I livelli di OPN correlano, inoltre, con la gravità della malattia e decrescono durante la fase di risoluzione;
- ii) negli stessi pazienti e controlli sono state dosate alcune citochine caratterizzanti i linfociti TH1 o TH2 rilevando un aumento significativo di IL-6 e di IL-10 nei pazienti rispetto ai controlli ( $p < 0,05$ ); è stata inoltre riscontrata una correlazione positiva tra i livelli di OPN e di IL-6 nei pazienti con SIRS e SG/SS ( $r = 0.3033$ ,  $p < 0.05$ );
- iii) mediante l'analisi della *Receiver Operator Characteristics* (ROC) *Curve*, è stato possibile dimostrare come i livelli sierici di OPN possono essere utilizzati come *marker* per discriminare i pazienti con SIRS da quelli con sepsi; infatti l'area sotto la curva (AUC) è 0.727 (95% IC=0.591-0.837;  $p = 0.0001$ ) per IL-6 e 0.796 (95% IC=0.667-0.892;  $p = 0.0001$ ) per OPN;
- iv) infine è stata ricercata una correlazione funzionale tra OPN e IL-6 testando l'effetto di OPN ricombinante (rOPN) sulla produzione di IL-6. Esperimenti *in vitro* hanno permesso di dimostrare che rOPN induce in maniera significativa ( $p < 0,05$ ) i livelli trascrizionali e la produzione di IL-6 in colture di monociti, attivati o meno con LPS. OPN è coinvolta anche nei processi patologici delle malattie autoimmuni. Infatti, topi MRL $lpr/lpr$ , geneticamente predisposti a sviluppare autoimmunità sistemica, mostrano un'elevata produzione di OPN e valori plasmatici elevati di OPN sono stati descritti in

pazienti affetti da LES e Artrite Reumatoide (AR), in cui è stata osservata una correlazione lineare tra i livelli di OPN circolante e la gravità della malattia. Inoltre, nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato che OPN agisce da fattore predisponente lo sviluppo di due malattie autoimmuni, una molto rara, la Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS) ed una invece più frequente, la Sclerosi Multipla (SM). L'ALPS, si sviluppa generalmente in età pediatrica ed è caratterizzata da 1) difetti dell'apoptosi linfocitaria dovuti a mutazioni a carico del sistema Fas/FasL; 2) sviluppo di manifestazioni autoimmuni, con associazioni variabili di anemia, trombocitopenia, neutropenia; 3) linfadenopatia e/o splenomegalia; 4) espansione di linfociti T  $TCR\alpha\beta^+$  doppi negativi (DN) per CD4 e CD8. Esiste inoltre una variante della malattia, denominata Malattia Autoimmune Linfoproliferativa di Dianzani (DALD), in cui i pazienti presentano un quadro clinico simile a quello dei pazienti con ALPS ma sono privi dell'espansione dei linfociti T DN.

Il modello animale dell'ALPS è rappresentato dai topi MRL *lpr* (*lymphoproliferation*) e *gld* (*generalized lymphoproliferative disease*), portatori di una mutazione "loss of function" in omozigosi, rispettivamente nei geni di Fas e FasL. Come nel modello murino, anche nei pazienti con ALPS la funzionalità di Fas è ridotta, a causa di mutazioni ereditarie deleterie che colpiscono geni coinvolti in questo sistema. La penetranza delle mutazioni causali dell'ALPS è spesso incompleta e lo sviluppo della malattia è favorito dal *background* genetico.

La scelta di OPN come possibile molecola coinvolta nell'ALPS, non è stata casuale, infatti, in passato nel nostro laboratorio, utilizzando un *macroarray* a cDNA è stato possibile comparare l'espressione di geni coinvolti nell'apoptosi e nell'attivazione cellulare, di una paziente con DALD e di suo fratello sano rilevando l'iper-espressione dell'mRNA di OPN. L'aumentata espressione di OPN è stata poi confermata nel siero dei pazienti con DALD e un'analisi del gene di OPN ha dimostrato che questa elevata espressione era dovuta a particolari varianti del gene di OPN, che aumentano di circa 8 volte il rischio di sviluppare DALD. Studi funzionali hanno poi dimostrato che OPN inibisce l'*Activation-Induced Cell Death* (AICD) dei linfociti, un meccanismo che affianca Fas nello spegnimento della risposta immunitaria, il che potrebbe spiegare l'effetto favorente sullo sviluppo della malattia. Un secondo dato emerso dall'analisi dello stesso *macroarray* è stata l'iper-espressione di *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1* (TIMP-1), noto inibitore delle metalloproteinasi (MMP), il quale svolge diverse funzioni biologiche, tra le quali la regolazione della proliferazione, la

sopravvivenza cellulare e il differenziamento di diversi tipi cellulari. Inoltre, recentemente è stato descritto un suo possibile ruolo in alcune malattie autoimmuni, come la SM o il diabete mellito di tipo 1. Questo dato è stato la premessa per lo studio del ruolo di TIMP-1 nella patogenesi dell'ALPS/DALD e la ricerca di una correlazione funzionale tra TIMP-1 e OPN, sviluppati in questa tesi.

Nel secondo articolo descritto in questa tesi sono presentati i seguenti risultati:

- i.* sono stati valutati i livelli sierici di TIMP-1 in 11 pazienti con ALPS, 21 con DALD, e 50 controlli e i risultati ottenuti dimostrano che i livelli di TIMP-1 sono significativamente più elevati nei pazienti con ALPS/DALD rispetto ai controlli sani ( $p < 0.05$ );
- ii.* testando l'effetto di rOPN *in vitro* è stato possibile dimostrare che rOPN induce in maniera significativa ( $p < 0.05$ ) la produzione di TIMP-1 in cellule mononucleate di sangue periferico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) e monociti di donatori sani;
- iii.* è stato valutato l'effetto di TIMP-1 ricombinante (rTIMP-1) nell'AICD e nella *Fas Induced Cell Death* (FICD), dimostrando come TIMP-1 inibisce entrambi i processi, il che suggerisce che elevati livelli di TIMP-1 potrebbero favorire lo sviluppo di ALPS/DALD inibendo l'apoptosi linfocitaria.

# ***ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI***

**1. VARIATIONS OF THE PERFORIN GENE IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS**

Cappellano G., Orilieri E., Comi C., Chiocchetti A., Bocca S., **Boggio E.**, Bernardone IS., Cometa A., Clementi R., Barizzone N., D'Alfonso S, Corrado L., Galimberti D., Scarpini E., Guerini FR., Caputo D., Paolicelli D., Trojano M., Figà-Talamanca L., Salvetti M., Perla F., Leone M., Monaco F. and Dianzani U. *Genes Immun.* 2008;5:438-44.

**2. SERUM LEVEL OF OSTEOPONTIN ARE INCREASED IN SIRS AND SEPSIS**

Vaschetto R., Nicola S., Olivieri C., **Boggio E.**, Piccolella F., Mesturini R., Damnotti F., Colombo D., Navalesi P., Della Corte F., Dianzani U. and Chiocchetti A. *Int. Care Med.*, 2008;34:2176-2184.

**3. ROLE OF TIMP-1 IN DEVELOPMENT OF AUTOIMMUNITY-LYMPHOPROLIFERATION**

**Boggio E.**, Indelicato M., Orilieri E., Bocca S, Mesturini R., Sarasso C., Mazzarino MC., Campagnoli MF., Ramenghi U., Dianzani U. and Chiocchetti A. *submitted.*



# ***INTRODUZIONE***

## **1. LE DIFESE IMMUNITARIE.**

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

Le cellule chiave dell'infiammazione sono i granulociti e i macrofagi, i quali cooperano con fattori umorali tra cui spicca il sistema del complemento e quello delle MMP. Granulociti e macrofagi eliminano gli agenti infettivi principalmente attraverso la fagocitosi. I macrofagi svolgono però anche un importante ruolo di amplificazione della risposta attraverso la produzione di citochine come IL-1 $\beta$ , IL-6 e *Tumour Necrosis Factor* (TNF)- $\alpha$ . Ciascun macrofago riconosce un'ampia varietà di agenti infettivi attraverso una serie di recettori di membrana che riconoscono molecole dette *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMP).

Le cellule chiave della risposta immunitaria adattativa sono i linfociti che possono agire direttamente contro l'agente estraneo (linfociti T) oppure attraverso la produzione di anticorpi (linfociti B). Ciascun linfocita riconosce una singola molecola (detta antigene) di uno specifico agente infettivo attraverso uno specifico recettore per l'antigene, che è un *T Cell Receptor* (TCR) per i linfociti T e un anticorpo per i linfociti B. Gli anticorpi riconoscono gli antigeni in forma nativa e possono essere secreti in forma solubile. I linfociti T riconoscono l'antigene (in genere una proteina) solo dopo che è stato processato e presentato su molecole del sistema maggiore di istocompatibilità (MHC) da parte di una cellula presentante l'antigene (APC), ovvero un macrofago, una cellula dendritica o un linfocita B. Dopo aver riconosciuto l'antigene, i linfociti provvedono alla sua eliminazione per lo più indirizzando selettivamente contro l'agente infettivo i sistemi effettori dell'infiammazione. I linfociti T comprendono linfociti T citotossici, capaci di uccidere le cellule infettate da virus, e i linfociti T helper (TH) capaci di produrre citochine che indirizzano la risposta immunitaria e infiammatoria. A seconda delle citochine prodotte i TH possono differenziare in diverse popolazioni effettrici, quali i TH1 caratterizzati dalla produzione di IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$  che sostengono l'infiammazione mediata da macrofagi, i TH2 che producono citochine in grado di sostenere la risposta anticorpale come IL-4 e IL-5, e i TH17 che producono IL-17 e sostengono l'infiammazione mediata da granulociti. Altri TH sono i T regolatori (Treg)

che producono IL-10 e *Transforming Growth Factor* (TGF)- $\beta$  i quali sono capaci di sopprimere la risposta immunitaria e infiammatoria.

Inflammatione e risposta adattativa sono cruciali per difenderci dagli agenti infettivi, tuttavia possono anche essere esse stesse causa di malattia, quando sono attivate in modo inappropriato. Questa tesi è focalizzata su due quadri patologici legati a un'inappropriata attivazione dell'inflammatione e dell'immunità adattativa, ovvero la sepsi e una malattia rara come l'ALPS. Nella prima è stata valutata l'azione della citochina OPN; nella seconda l'azione dell'inibitore delle MMP, TIMP-1.

## 2. LA SEPSI.

### 2.1 Definizioni.

La sepsi è una condizione morbosa il cui evento iniziale è l'ingresso nell'organismo di una dose elevata di antigeni batterici che invadono il torrente ematico. Questo determina l'attivazione dei meccanismi di difesa messi in atto dal sistema immunitario al fine di rimuovere tale invasione. Da un punto di vista clinico la sepsi è un'entità complessa, e la necessità di un linguaggio comune per una corretta interpretazione clinica ha portato alla pubblicazione, nel 1992 (American College), delle definizioni di sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS), sepsi, sepsi grave (SG) e shock settico (SS) (Lewy MM. et al.,2003).

Con il termine SIRS, si definisce una condizione di risposta infiammatoria sistemica ad un insulto di origine non infettiva quale un trauma, un insulto chimico o termico. Clinicamente è definita dalla presenza di due o più dei seguenti criteri:

- 1) temperatura orale  $<36^{\circ}\text{C}$  o  $>38^{\circ}\text{C}$ ,
- 2) conta leucocitaria  $<4000/\mu\text{l}$  o  $>12000/\mu\text{l}$  o presenza allo striscio di sangue periferico di un numero maggiore del 10% di polimorfonucleati immaturi,
- 3) tachipnea, ovvero una frequenza respiratoria maggiore di 20 atti respiratori al minuto o  $\text{PaCO}_2 < 32\text{mmHg}$ ,
- 4) tachicardia, ovvero frequenza cardiaca  $>90$  battiti al minuto.

Il consenso per tale definizione non è unanime, essendo i criteri proposti troppo generali.

La Sepsis è stata definita come la presenza dello stato di SIRS accompagnato però da un'infezione accertata o anche solo presunta, il che rende spesso difficile la distinzione tra SIRS e sepsi. I criteri che definiscono la sepsi sono stati ampliati in modo da includere anche segni di precoce disfunzione d'organo.

La SG è un quadro di sepsi accompagnato da disfunzione d'organo conseguente all'ipotensione e all'ipoperfusione. La *Multiple Organ Dysfunction Syndrome* (MODS) è caratterizzata da disfunzione a carico di più di un organo e richiede necessariamente un intervento per il mantenimento della corretta omeostasi. La disfunzione d'organo può essere associata a oliguria, acidosi metabolica, alterazione dello stato mentale e ipossiemia. La percentuale di pazienti con disfunzione d'organo è oggi circa 30.2% e gli organi più frequentemente colpiti sono i polmoni e i reni (Guidet B. et al.,2005). La SG

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

Lo SS è l'esacerbazione del quadro precedente con scompenso cardiocircolatorio acuto. Esso è caratterizzato da ipotensione persistente, non imputabile ad altre cause, che non risponde al carico volemico e in cui si rende necessaria la somministrazione di amine (noradrenalina ed epinefrina) per il controllo efficace del circolo. Il quadro di ipotensione è definito da una pressione sistolica inferiore a 90 mmHg o da una pressione arteriosa media inferiore a 60 mmHg o da una riduzione di pressione sistolica superiore a 40 mmHg rispetto al valore normale del paziente, nonostante adeguato carico volemico.

La distinzione tra SIRS e sepsi è cruciale al fine di stabilire il trattamento clinico adeguato e la prognosi. Persiste la mancanza di *markers* validati da poter utilizzare per la diagnosi di sepsi, anche se biomarcatori come la procalcitonina (PCT) o il *soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1* (sTREM-1), sono spesso utilizzati per la diagnosi differenziale tra SIRS e sepsi (Barati M. et al.,2009). Tuttavia permane incertezza in quanto molti casi privi di infezioni sono associati comunque ad aumentati livelli di questi biomarcatori.

## **2.2 Etiologia.**

Gli agenti eziologici più frequenti della sepsi sono Escherichia coli, Klebsiella, Enterobacter, Proteus Pseudomonas aeruginosa (associata a terapia antibiotica ed ustioni), Bacterioides fragilis (causa più comune di setticemia anaerobia) Staphylococcus aureus, Streptococcus Pneumoniae, Streptococcus pyogenes (Marshall JC. et al.,1988). Le infezioni più frequenti (oltre l'80% delle cause di batteriemia) sono le infezioni dell'apparato respiratorio (broncopolmoniti, bronchiti), del tratto genito-urinario (cistiti), intraddominali, e a carico dell'albero venoso per processi tromboflebitici da dispositivo intravascolare in corso di terapia infusioneale. Talvolta all'origine di una sepsi vi è un focolaio primitivo ben evidente, come ferite o lesioni cutanee o infezioni d'organo diagnosticate; tuttavia, spesso il focolaio infettivo di partenza non viene riconosciuto (Lavoie PM. et al.,1999).

Lo sviluppo di sepsi deriva da uno squilibrio fra la patogenicità batterica e i meccanismi di difesa dell'ospite. La soglia per considerare un'infezione "invasiva" è fissata a  $10^5$  batteri per grammo di tessuto o millilitro di liquido biologico. Alcuni batteri possiedono o elaborano sostanze e tossine che ne aumentano la virulenza. Le endotossine,

componenti strutturali dei batteri Gram negativi, ed in particolare la porzione nota come lipide A, sono implicate in danni complessi, tra i quali per esempio, il blocco del metabolismo ossidativo a livello mitocondriale. I Gram positivi, invece, producono potenti esotossine, implicate nella genesi dello SS. Queste esotossine sono di grande interesse, poiché si comportano da superantigeni, causando una massiva attivazione di linfociti T e il rilascio di linfocine pro-infiammatorie. Gli antibiotici hanno significativamente ridotto l'incidenza di infezioni se usati nella profilassi di interventi con importante rischio di contaminazione batterica; ciò nonostante non hanno ridotto l'impatto della sepsi con conseguente mortalità nel paziente chirurgico. Difetti nella risposta immunitaria umorale o cellulo-mediata e nella reazione flogistica, peraltro dimostrati in pazienti politraumatizzati o con gravi ustioni, possono spiegare un'evoluzione sfavorevole dell'infezione anche dopo l'attuazione di una corretta terapia antibiotica.

### **2.3 Patogenesi.**

L'evento iniziale la sepsi è rappresentato dall'ingresso nell'organismo di antigeni batterici in dose elevata che raggiungono il circolo sanguigno. In seguito, il sistema immunitario dell'ospite riconosce le molecole extra-cellulari dei microrganismi. La più studiata, in quanto più frequentemente coinvolta, è l'LPS, molecola della membrana esterna dei batteri Gram negativi che, in circolo, si lega alle lipoproteine ad alta densità (HDL). A questo segue l'attivazione del sistema monocitico-macrofagico, mediato dalla stimolazione del *Toll-like receptor 4* (TLR4), e dei linfociti presenti nei tessuti linfoidi; ciò comporta la produzione di fattori solubili che attivano altre cellule (López-Bojórquez LN. et al.,2004). I fattori meglio caratterizzati sono le citochine pro-infiammatorie quali TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. I macrofagi producono anche IL-12, che attiva le cellule *Natural Killer* (NK) e i linfociti T, che a loro volta producono IFN- $\gamma$  che attiva i macrofagi; ciò realizza un processo di amplificazione della reazione infiammatoria. IL1- $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  predicono il danno tissutale, l'entità della flogosi e la presenza di infezione e batteriemia. Inoltre, i macrofagi residenti nel fegato (cellule di Kupffer) producono le proteine della fase acuta in risposta all'aumento di IL-6. La Proteina C Reattiva (PCR) è un utile *marker* di attivazione flogistica e predice il rischio di malattia cardiovascolare; questa proteina della fase acuta svolge un'azione pro-infiammatoria sull'endotelio e sui monociti.

#### **2.4 Terapia.**

La terapia antibiotica deve essere iniziata entro 3 ore dall'ammissione. La scelta dell'antibiotico dovrebbe essere per lo più orientata ad una copertura ad ampio spettro e rapportata al sito di infezione, alle condizioni del paziente, alla presenza di allergie. Multipli studi hanno dimostrato che una terapia antibiotica precoce e adeguata riduce la mortalità in questi pazienti.

La Proteina C attivata ricombinante è il primo agente anti-infiammatorio che ha mostrato un'efficacia nel trattamento della sepsi, riducendo il rischio relativo di morte dal 19,4% al 6,1% (Bernard GR. et al.,2001). L'efficacia di questo agente anti-coagulante nei pazienti con sepsi è da attribuire all'inibizione della formazione della trombina con conseguente riduzione dell'infiammazione, attivazione delle piastrine, degranolazione dei mastociti e reclutamento di neutrofili. La Proteina C attivata mostra proprietà anti-infiammatorie in quanto è in grado di ridurre la produzione di citochine e l'adesione da parte dei monociti (Matthay MA. et al.,2001). Attualmente il trattamento con Proteina C attivata è utilizzato per i pazienti con sepsi che presentano un quadro di MODS severo.

Recentemente è stato dimostrato che i pazienti con sepsi trattati con insulina presentano un tasso di mortalità ridotto rispetto ai pazienti trattati con una terapia convenzionale (12.5% vs 29.5%). Questo effetto potrebbe essere spiegato dal fatto che la riduzione della glicemia possa migliorare la funzione fagocitica dei neutrofili nei confronti dei batteri oppure l'insulina potrebbe prevenire la morte per apoptosi di linfociti B, T e cellule dendritiche, attivando la via di sopravvivenza controllata da PI-3 chinasi/AKT (Hotchkiss RS. et al., 1999; Van den Berghe G. et al.,2001).

Visto il ruolo centrale svolto dalle citochine nella patogenesi della sindrome settica, si sono investigati interventi terapeutici volti a modulare la risposta immune attraverso il blocco delle citochine naturali o attraverso l'uso di citochine di sintesi. Lo scopo era quello di ottenere un'azione anti-infiammatoria selettiva, limitando il campo degli effetti collaterali (Eigler A. et al.,1997). Tra le citochine, il TNF- $\alpha$  riveste un ruolo centrale nell'induzione e nel mantenimento della flogosi, attraverso la sua azione sui macrofagi e l'attivazione di un circolo vizioso coinvolgente *Nuclear Factor Kappa B* (NF-kB) e le citochine pro-flogogene. Le strategie finora studiate al fine di inibire il TNF- $\alpha$  comprendono l'infusione endovenosa di anticorpi monoclonali contro questa citochina (Infliximab), l'uso del recettore solubile per il TNF- $\alpha$  coniugato con il frammento Fc di immunoglobuline di classe IgG (Etanercept) e la somministrazione di farmaci che

diminuiscono l'emivita dell'RNA messaggero del TNF- $\alpha$  (Abraham E. et al.,1997). Recenti *trials* clinici, impostati sull'inibizione del TNF- $\alpha$  nella SG e nello SS iniziale, riportano risultati incoraggianti in termini di riduzione della mortalità nei soggetti trattati. È però fondamentale individuare il momento ideale in cui iniziare la terapia, per poter realmente ottenere un beneficio.

### ***2.5 Risposta immunitaria in corso di sepsi.***

La risposta immunitaria che si ha in corso di sepsi dipende dalla virulenza del patogeno, dal sito d'infezione, dalle condizioni fisiche del paziente e, probabilmente, dalla presenza di particolari polimorfismi nei geni che codificano per alcune citochine, come IL-12, o per i loro recettori, come il recettore per TNF- $\alpha$  o per IL1- $\beta$ . La presenza di questi polimorfismi può condizionare la funzionalità di citochine pro- o anti-infiammatorie e quindi la risposta ipo- o iper-infiammatoria nei confronti dell'infezione (van Deventer SJ., et al.,2000). I pazienti con sepsi presentano caratteristiche dell'immunosoppressione, con ridotta *clearance* virale e aumentata predisposizione a contrarre infezioni nosocomiali (Lederer JA. et al.,1999). In corso di sepsi prolungata si assiste ad una morte per apoptosi dei linfociti B, dei linfociti T CD4<sup>+</sup> e delle cellule dendritiche con conseguente diminuzione della produzione di anticorpi, attivazione dei macrofagi e presentazione degli antigeni. Studi condotti su animali con infiammazione acuta hanno dimostrato che prevenire l'apoptosi delle cellule del sistema immunitario migliora le aspettative di sopravvivenza (Hotchkiss RS. et al.,1999).

La sepsi è caratterizzata dalla presenza contemporanea di una risposta pro- e anti-infiammatoria definite rispettivamente SIRS e CARS. Nella fase ipereattiva si ha produzione di citochine pro-infiammatorie, mentre nella fase di immunoparalisi si assiste al blocco di ogni attività da parte del sistema immunitario. Pazienti in SS hanno quindi una risposta immunologica bifasica: all'inizio essi manifestano una risposta infiammatoria all'infezione, dovuta principalmente a citochine quali TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6. Successivamente, nella fase anti-infiammatoria, l'organismo regola queste risposte producendo citochine anti-infiammatorie come IL-10, ed inibitori solubili quali il recettore del TNF- $\alpha$  o IL1-RA, una forma inattiva del recettore di IL-1 (Riedemann NC. et al.,2003).

### 3. IL SISTEMA IMMUNITARIO E L'APOPTOSI.

#### 3.1 Tolleranza centrale e periferica.

L'apoptosi svolge un ruolo fondamentale sia nello sviluppo delle cellule degli organi linfoidi primari, sia nella regolazione della risposta immunitaria delle cellule mature. Una delle caratteristiche del sistema immunitario è la capacità di discriminare tra antigeni *self* e *non-self*, facendo in modo che si sviluppi una risposta immunitaria solo contro sostanze estranee all'organismo e favorendo la tolleranza verso gli antigeni autologhi (fenomeno noto come *tolleranza al self*). Nel caso di una mancata tolleranza segue una risposta immune verso i propri costituenti antigenici, dando origine a malattie autoimmuni.

I processi fondamentali che richiedono una corretta morte cellulare programmata sono la maturazione dei linfociti B e T nel midollo osseo e nel timo, il controllo dell'attivazione e dello spegnimento della risposta immune e lo sviluppo di attività effettrici, come l'attività citotossica (Nat R. et al.,2002).

Lo sviluppo dei linfociti T non è regolato solo dalla proliferazione e dal differenziamento, ma anche da una corretta apoptosi. Infatti, l'attivazione dei linfociti a cellule effettrici deve essere antigene specifica e deve essere limitata nel tempo: dopo che l'antigene è stato eliminato, i linfociti devono andare incontro a morte cellulare programmata. Nella prima fase della selezione timica, definita di *selezione positiva*, viene consentita la sopravvivenza solo dei timociti i cui TCR si adattano alle molecole MHC espresse dalle cellule epiteliali timiche; tutti gli altri timociti non ricevono questo segnale di sopravvivenza e muoiono per apoptosi. Durante una seconda fase si verifica il processo di *selezione negativa* in cui si ha l'eliminazione dei timociti con TCR specifico per peptidi *self* associati alle molecole MHC *self*. Quindi i timociti che compiono uno scorretto processo di riarrangiamento del TCR o riconoscono antigeni *self*, sono eliminati per apoptosi.

La delezione dei cloni linfocitari autoreattivi non si esaurisce nella selezione a livello degli organi linfatici centrali. Questo processo, infatti, non riesce a riconoscere tutti i cloni autoreattivi, poiché non tutti gli antigeni *self* sono rappresentati nel midollo osseo e nel timo. La presenza di linfociti T potenzialmente autoreattivi in periferia non porta necessariamente allo sviluppo di malattie autoimmuni in quanto queste cellule possono ancora essere controllate da meccanismi di tolleranza periferica.



La corretta attivazione del linfocita T, che porta alla sua proliferazione e differenziamento a linfocita effetore, richiede la concomitanza di due segnali: un primo segnale legato all'interazione del TCR con l'antigene e un secondo segnale legato all'interazione di una molecola co-stimolatoria del linfocita T col suo ligando, espresso dalla cellula APC. Nel caso del linfocita T, la molecola co-stimolatoria è CD28, che interagisce con i ligandi CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2) espressi dalle APC attivate. Il riconoscimento dell'antigene in assenza del secondo segnale, porta all'inattivazione del linfocita mediante induzione di anergia o di morte cellulare programmata. Questo sistema fa sì che la risposta immunitaria specifica sia attivata esclusivamente in un contesto di danno cellulare, riducendo il rischio di aggressioni contro il *self*.

Dopo la sua attivazione, la risposta immunitaria viene spenta attraverso meccanismi di spegnimento che portano alla morte apoptotica dei linfociti effettori. Lo spegnimento della risposta immunitaria è essenziale per garantire una protezione nei confronti dell'autoimmunità: se i linfociti non vanno in apoptosi dopo che gli antigeni *non-self* sono stati eliminati, c'è il rischio che riconoscano per errore antigeni *self* e scatenino una reazione autoimmune (Peng Y. et al.,2007).

L'apoptosi può essere indotta attraverso due vie principali: la via estrinseca innescata da specifici recettori di morte espressi sulla membrana cellulare e la via intrinseca, che agisce a livello del mitocondrio. I recettori di morte trasmettono segnali apoptotici grazie al legame con uno specifico ligando (Ashkenazi A. et al.,1998).

### **3.2 Il sistema Fas/Fas Ligando (FasL).**

Fas (CD95/Apo1) è una glicoproteina transmembrana di 45-48 Kd. Esso è un recettore della superficie cellulare, appartenente alla superfamiglia dei recettori del *Tumor Necrosis Factor Receptor* (TNFR), una vasta famiglia di recettori coinvolti nello sviluppo e nella maturazione dei linfociti. Una classificazione di questa famiglia individua una sottofamiglia di TNFR deputati alla trasmissione di segnali apoptotici e per questo chiamati recettori di morte. I recettori di morte comprendono, oltre a Fas, il TNFR1, il TNFR2, il recettore per la linfotossina, quello per il *Nerve Growth Factor* (NGF), le molecole CD30, CD27, CD40 e i recettori di *TNF-Related-Apoptosis-Inducing-Ligand* (TRAIL).

Il sistema Fas/FasL è il sistema molecolare meglio caratterizzato nello spegnimento della risposta immunitaria. Esso rappresenta uno dei meccanismi attraverso il quale i

linfociti con capacità citotossiche uccidono il bersaglio: essi esprimono infatti elevati livelli di FasL che, interagendo con Fas espresso sulla superficie delle cellule bersaglio, innesca la morte cellulare programmata di quest'ultime. Inoltre, i linfociti attivati esprimono elevati livelli di Fas e sono sottoposti alla regolazione negativa da parte di linfociti o altri tipi cellulari che esprimono FasL.

Il recettore Fas è costituito da una porzione extra-cellulare ricca di cisteine, in grado di legare il suo ligando, da una regione transmembrana e da una intra-cellulare, che contiene il *Death Domain* (DD), il quale interagendo con la proteina *Fas Associated Death Domain* (FADD) trasduce il segnale di morte. Il legame di Fas con il suo ligando porta alla trimerizzazione del recettore inducendo la formazione del *Death-Inducing Signaling Complex* (DISC), costituito dall'associazione tra Fas, la molecola adattatrice FADD e la pro-caspasi 8. L'attivazione della caspasi 8 effettrice innesca una cascata proteolitica attivatoria che coinvolge la caspasi 10. Le caspasi 8 e 10 attivano le caspasi esecutrici 3, 7 e 6 (Nagata S. et al.,1997; Los M. et al., 2001).

L'apoptosi può essere innescata anche attraverso la via intrinseca. Il citocromo c è la molecola chiave di questa via; esso è rilasciato dal mitocondrio nel citoplasma in seguito alla depolarizzazione della membrana mitocondriale. Il citocromo c si lega successivamente alla molecola adattatrice *Apoptotic Protease-Activating Factor-1* (Apaf-1) che, legando la pro-caspasi 9, porta alla formazione di un complesso detto apoptosoma, il quale induce l'attivazione della caspasi 9 (Green DR. et al.,1998; Kroemer G. et al.,1995).

Le caspasi sono proteasi cisteina-dipendenti che attivano il loro substrato per proteolisi a livello di un residuo specifico di acido aspartico. La cascata delle caspasi attiva numerosi effettori che alla fine conducono alla morte cellulare. Tutte le caspasi sono prodotte sotto forma di pro-enzimi inattivi, e vengono attivati mediante la scissione proteolitica della subunità inibitoria: l'attivazione può essere autocatalitica o mediata da un'altra caspasi (Kumar S. et al.,1999). La sensibilità all'apoptosi da parte dei linfociti T non solo correla con l'espressione di Fas, ma dipende anche dalla *down-regulation* di proteine anti-apoptotiche come ad esempio *FLICE-like inhibitory protein* (FLIP). FLIP inibisce l'apoptosi indotta da Fas e da altri recettori di morte modulando l'attività del DISC e inibendo il reclutamento di caspasi 8.

Topi *knock-out* per Fas o Fas ligando sviluppano disordini linfoproliferativi associati ad autoimmunità, il che suggerisce un ruolo critico della morte cellulare mediata da Fas nelle malattie autoimmuni (Rieux-Laucat F. et al.,2003). Mutazioni a carico di Fas o

del suo ligando sono note indurre lo sviluppo di malattie autoimmuni nel topo e nell'uomo (Siegel RM. et al.,2000).

### **3.3 *L'Activation Induced Cell Death (AICD).***

Con il termine AICD si intende un processo attraverso il quale i linfociti T attivati per mezzo del TCR e ristimolati, vanno incontro ad un processo di morte cellulare che coinvolge vari recettori, tra cui Fas e TNFR (Krammer P. et al.,2007).

Dopo l'attivazione del linfocita, la fase di espansione è seguita da una fase in cui il numero di linfociti T diminuisce e ritorna a livelli normali. Questo processo è finemente regolato e richiede uno *switch* tra la vita e la morte dei linfociti T attivati. In periferia i linfociti T se continuamente stimolati dal TCR vanno incontro a AICD, che in parte risulta dall'interazione tra il recettore Fas e il suo ligando. L'AICD oltre a coinvolgere la via estrinseca dell'apoptosi, coinvolge anche la via intrinseca, in particolare il mitocondrio e i membri della famiglia di Bcl<sub>2</sub>.

Recentemente anche NF- $\kappa$ B è stato identificato come un fattore in grado di regolare l'AICD attraverso *Hematopoietic Progenitor Kinase1* (HPK1) (Brenner D. et al.,2005; Brenner D. et al.,2007). Dopo l'attivazione e l'espansione dei linfociti T, il taglio proteolitico di HPK1 operato da caspasi 3, genera un residuo C-terminale (HPK1-C) in grado di inibire NF- $\kappa$ B, attraverso la fosforilazione di IKK $\beta$ . A questi eventi seguono l'inibizione della trascrizione di differenti geni anti-apoptotici *target* di NF- $\kappa$ B e l'innescamento dell'AICD. L'AICD mediata da HPK1-C è indipendente da Fas, ma coinvolge le caspasi.

L'AICD mediata da Fas gioca un ruolo fondamentale nella remissione spontanea dell'EAE, suggerendo l'importanza di questo meccanismo nella risposta autoimmune. Un difetto di AICD è stato riscontrato in un modello murino di AR associato ad un'iper-espressione di c-FLIP, principale inibitore della via di Fas, con conseguente iper-proliferazione dei linfociti CD4<sup>+</sup> autoreattivi (Zhang J. et al,2004).

### **3.4 *Le malattie autoimmuni e i difetti apoptotici.***

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

Dal punto di vista clinico le malattie autoimmuni si dividono in sistemiche, come ad esempio l'ALPS e il LES, e organo-specifiche, come ad esempio il diabete mellito di

tipo1, la SM e la tiroidite di Hashimoto. Dal punto di vista del meccanismo immunopatogenetico si distinguono in malattie mediate da anticorpi o mediate da cellule.

La maggior parte delle malattie autoimmuni sono multifattoriali e sono causate dalla combinazione di fattori genetici e di fattori ambientali (Tsonis IA. et al.,2007).

I fattori ambientali meglio noti sono le infezioni che possono scatenare la malattia attraverso vari meccanismi: la presenza di antigeni virali simili ad antigeni *self*, può determinare una “cross-reazione” contro il *self* (*mimetismo molecolare*); oppure l’infezione può danneggiare i tessuti causando la liberazione di antigeni normalmente sequestrati, che sono erroneamente riconosciuti come *non self*; oppure le infezioni possono innescare un processo infiammatorio che funziona da *adiuvante* per l’innesco della risposta autoimmune (Kuijf ML. et al.,2007).

I fattori genetici meglio noti sono il sesso, che condiziona la reattività immunitaria attraverso l’azione degli ormoni sessuali (il sesso femminile è in genere il più predisposto) e gli alleli delle molecole MHC, che condizionano i peptidi presentati ai linfociti autoreattivi.

Più recentemente tra i fattori genetici, sono stati chiamati in causa difetti a carico del processo apoptotico. Un difetto dell’apoptosi può favorire una risposta autoimmune in differenti modi. In primo luogo, le cellule apoptotiche esprimono in membrana auto-antigeni inusuali per una cellula normale, e il rallentamento della morte cellulare rende questi antigeni *self* più esposti al sistema immunitario. In secondo luogo, alterazioni del processo apoptotico possono favorire fenomeni necrotici che, a differenza dell’apoptosi, determinano la comparsa di reazioni infiammatorie che favoriscono un’efficace presentazione di antigeni autologhi al sistema immunitario. In terzo luogo, un difetto dell’apoptosi può causare un rallentamento dello spegnimento della risposta immunitaria, che può a sua volta favorire lo sviluppo di “cross-reazioni” tra *non self* e *self*.

### ***3.5 La sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS).***

L’ALPS, è una malattia autoimmune dell’infanzia, originariamente nota come Sindrome di Canale-Smith (Canale VC. et al.,1967).

È caratterizzata da un disordine dell’omeostasi dei linfociti causata da un difetto dell’apoptosi, dall’accumulo di linfociti nella milza e nei linfonodi e da espansione di linfociti T TCR $\alpha\beta$ -positivi e DN per CD4 e CD8, (Straus SE. et al.,1999; Bleesing J. et al.,2001). Questi linfociti T DN si pensa che possano originare da linfociti T attivati

“esausti” i quali non vanno incontro a morte cellulare programmata in seguito alla riattivazione da parte del loro TCR o all’ingaggio da parte di FasL.

Il tratto principale dei pazienti con ALPS è la linfoproliferazione che si manifesta con linfadenomegalia e splenomegalia massive, e il frequente sviluppo di manifestazioni autoimmuni. Nell’età adulta i pazienti con ALPS possono frequentemente sviluppare linfomi.

La diagnosi di ALPS è eseguita in base alla presenza di autoimmunità, linfadenopatia non maligna, splenomegalia, presenza di linfociti T DN circolanti superiori all’2%, difetti dell’apoptosi da parte di linfociti attivati *in vitro* (Lopatin U. et al.,2001). L’unico trattamento farmacologico per l’ALPS è la somministrazione di corticosteroidi o altri immunosoppressori anche se, a lungo termine, sono molteplici gli effetti collaterali.

Studi immunologici hanno dimostrato che i pazienti con ALPS, presentano una risposta preferenziale di tipo TH2 con ridotta produzione di IL-2 e IFN- $\gamma$  e aumentati livelli di IL-4 e IL-5. A questo va aggiunto che in questi pazienti i livelli di IL-10 sono notevolmente aumentati rispetto a quelli di IL-12. IL-10 altera il bilancio TH1/TH2 svolgendo un ruolo da antagonista nello sviluppo dei TH1, favorendo indirettamente la linea TH2 e la crescita di linfociti B con successiva produzione di autoanticorpi (Rennò T. et al.,1995).

Il difetto immunitario principale dei pazienti con ALPS sembra tuttavia essere il difetto funzionale del recettore di morte Fas. A questo difetto, che ha basi genetiche in genere ereditarie, si attribuisce un ruolo causale nello sviluppo della malattia (Campagnoli MF. et al.,2006; Martin DA. et al.,1999).

Fino ad oggi sono state identificate quattro varianti di ALPS classificate in base al difetto genetico causale:

ALPS-Ia, con mutazioni a carico del gene di Fas;

ALPS-Ib, con mutazioni a carico del gene di Fas ligando;

ALPS-II, con mutazioni a carico del gene di caspasi 10;

ALPS-III, con difetto genetico non identificato.

Recentemente è stata identificata una forma della malattia con mutazioni a carico del gene di N-Ras, denominata ALPS IV, la quale non presenta difetti a carico del sistema Fas-FasL, ma coinvolge la via del mitocondrio (Oliveira B. et al.,2007).

Nel nostro laboratorio è stato identificato un gruppo di pazienti con un quadro clinico simile all’ALPS (ridotta funzionalità di Fas, autoimmunità prevalentemente ematologiche, accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari, con linfadenopatia

e/o splenomegalia), ma privo della classica espansione di linfociti T DN nel sangue periferico. Questa forma di ALPS è stata denominata *Dianzani's Autoimmune Lymphoproliferative Disease* (DALD) da McKusick sul sito OMIM (riferimento OMIM #605233; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>).

I linfociti T dei soggetti con DALD sono resistenti alla morte cellulare indotta da Fas, ma non presentano mutazioni in Fas, FasL o caspasi-10. Inoltre, i linfociti T della maggior parte di questi pazienti sono anche resistenti alla morte cellulare indotta da etoposide, che agisce direttamente sulla via mitocondriale. La componente ereditaria della malattia è suggerita dal fatto che anche i genitori dei pazienti presentano una ridotta funzionalità di Fas (pur in assenza di malattia). Inoltre, la fusione somatica dei linfociti T Fas-resistenti dei pazienti con una linea linfocitaria tumorale Fas-sensibile determina la produzione di cellule ibride Fas-resistenti. Questi dati suggeriscono il coinvolgimento di mutazioni che colpiscono la via di Fas a valle del recettore e determinano la produzione di molecole che esercitano un'attività dominante negativa sulla funzione di Fas (Dianzani U. et al.,1997).

Nell'ALPS esiste una grande variabilità clinica, non solo tra pazienti con mutazioni differenti, ma anche tra pazienti appartenenti alla medesima famiglia e con la stessa mutazione. Spesso la malattia è legata a mutazioni eterozigoti con dominanza incompleta e il genitore portatore della mutazione è in genere sano (Jackson CE. et al.,1999). L'espressione della malattia può dipendere dal tipo e dalla gravità delle mutazioni e/o dalla co-presenza di altri fattori predisponenti di tipo genetico o ambientale (Ramenghi U. et al.,2000). Dal punto di vista dei fattori predisponenti genetici è stato proposto un ruolo a carico di varianti del gene di OPN e di perforina. In entrambi i casi le varianti geniche predisponenti agirebbero intervenendo in modo svantaggioso sul sistema di spegnimento della risposta immunitaria (Chiocchetti A. et al.,2004; Clementi R. et al.,2006).

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

La tipica mutazione *lpr* è causata da un difetto di *splicing* e determina una ridotta espressione del recettore in membrana, mentre una variante della mutazione, la forma *lpr<sup>cg</sup>* è una mutazione puntiforme nel DD del recettore Fas che ne riduce l'attività. La mutazione *gld* è invece una mutazione puntiforme nel dominio C-terminale di FasL che ne riduce la capacità di interagire con Fas (Benihoud K. et al.,1997).

Come nell'uomo, anche nel topo il *background* genetico sembra influenzare la penetranza di queste mutazioni, in quanto la malattia si manifesta in modo molto grave nel ceppo murino MRL, mentre il quadro risulta molto più lieve nel ceppo Balb/C (Rieaux-Laucat F. et al.,1995; Watanabe-Fukunaga R. et al.,1992).

## 4. OSTEOPONTINA (OPN).

### 4.1 Caratteristiche strutturali e funzionali.

OPN è una glicoproteina acida fosforilata a livello di diversi residui di serina ed è implicata in diversi eventi fisiologici e patologici tra i quali rimodellamento osseo, infiammazione, cancro, angiogenesi, patologie cardiovascolari e malattie autoimmuni (Denhardt DT. et al.,2001; Gravallesse EM. et al.,2003; Mazzali M. et al.,2002; Naldini A. et al.,2006). OPN esiste come proteina immomobilizzata facente parte della matrice extra-cellulare, ma anche come citochina solubile nei fluidi biologici, agendo come importante componente dei processi infiammatori e della risposta immunitaria (O'Regan AW. et al 2000; Standal T. et al.,2004).

Fu inizialmente identificata come la più abbondante sialoproteina presente nel tessuto osseo (Prince CW. et al.,1987), ma è stata successivamente ritrovata anche nella placenta, nel tessuto renale, nel muscolo liscio e nei leucociti.

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

OPN è codificata da un gene multiallelico formato da 7 esoni e 6 introni e localizzato nell'uomo sul cromosoma 4 (4q21-q25). Il suo peso molecolare varia tra 25 e 80 kDa in base ai processi post-trascrizionali ai quali è sottoposta, tra cui glicosilazione, fosforilazione e clivaggio ad opera della trombina, a livello dei residui R<sup>168</sup> S<sup>169</sup>. In particolare, in seguito al taglio proteolitico operato dall trombina, OPN espone la sequenza peptidica SVVYGLR, importante per promuovere l'adesione delle cellule che esprimono le integrine  $\alpha 9$  e  $\alpha 4$ . OPN subisce tagli proteolitici anche da parte delle MMP, in particolare della MMP-3 e della MMP-7. Inoltre, OPN possiede una sequenza tripeptidica "Arginino-Glicina-Aspartato" (RGD) a livello della quale può essere abbondantemente glicosilata. OPN attraverso il dominio RGD è in grado di interagire con le integrine  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$ ,  $\alpha \nu\beta 1$ ,  $\alpha \nu\beta 3$  e  $\alpha \nu\beta 5$ , favorendo i meccanismi di adesione di linfociti T e B, macrofagi, piastrine, osteoclasti, e cellule del muscolo liscio. È stato dimostrato che il legame di OPN con l'integrina  $\alpha \nu\beta 3$  media la migrazione delle cellule endoteliali durante l'angiogenesi (Senger DR. et al.,1996; Mitsiades N. et al.,2001).



OPN è in grado di interagire anche con diverse isoforme di CD44, in particolare con CD44<sub>v6-7</sub>. Questa interazione media la funzione chemotattica di OPN, riduce l'espressione di IL-10 e IL-4, e favorisce la produzione di IL-12 (O'Regan A. et al.,2000; Denhardt DT. et al.,2001). CD44 è una proteina di membrana glicosilata, coinvolta nell'adesione e nell'*homing* dei linfociti. Il legame di OPN sia con CD44 sia con le integrine polarizza i linfociti T verso una risposta TH1 (Ashkar S. et al.,2000). Sono state identificate tre isoforme di OPN che si generano in seguito a *splicing alternativo*: OPNa di 945bp che codifica per la proteina intera, OPNb di 903bp che presenta una delezione di 14 amminoacidi nell'esone 5 e OPNc di 864bp che presenta una delezione di 28 amminoacidi nell'esone 4 (Young MF. et al, 1990; Giacomelli F. et al.,2004). Recentemente è stata identificata una forma intra-cellulare di OPN (iOPN) la quale viene generata a partire da un sito di trascrizione alternativo non-AUG, a valle di quello canonico, che determina la perdita del peptide segnale (Shinohara ML. et al.,2008). Il ruolo principale attribuito a iOPN è quello di inibire la produzione di IL-27, potente inibitore della produzione di IL-17, da parte delle cellule dendritiche, favorendo quindi lo sviluppo di un fenotipo TH17 (Shinohara ML. et al.,2008).

#### **4.2 Ruolo nell'infiammazione.**

Sebbene identificata nel 1985, il coinvolgimento di OPN nel processo infiammatorio e nella risposta immunitaria è stato descritto solo negli ultimi anni. Diversi mediatori dell'infiammazione, come TGF- $\alpha$  e IL-1, inducono la trascrizione di OPN, attraverso l'attivazione di *Protein Kinase C* (PKC) (Denhardt DT. et al.,2001).

OPN è una molecola con un duplice ruolo, pro- ed anti-infiammatorio. Per quello che riguarda la sua azione pro-infiammatoria, agisce come agente chemoattrattivo, favorisce l'adesione dei macrofagi e modula la funzione di macrofagi e linfociti T *in vitro* (O'Regan A. et al.,1999). È noto che OPN è prodotta dai linfociti T nelle prime fasi di attivazione e che recluta e attiva i macrofagi a livello del sito infiammatorio. *In vivo*, la somministrazione subcutanea di OPN induce il richiamo locale di macrofagi (Rollo EE. et al.,1996). Questo è mediato dall'estremità C-terminale della proteina, che si crea dopo il taglio proteolitico mediato dalla trombina, mentre il legame con il recettore CD44, a livello dell'estremità N-terminale, promuove la chemotassi e l'attivazione dei macrofagi (Lin YH. et al.,2001).

OPN è coinvolta nell'infiltrazione macrofagica e linfocitaria in risposta a diversi stimoli *in vivo* ed è espressa dagli istiociti nei granulomi di varia natura come nella tubercolosi

e nella sarcoidosi. Nel topo, OPN costimola i macrofagi, attivati da LPS, a produrre IL-12 ed inibisce la produzione di IL-10. In linea con quest'osservazione, topi *knock-out* per OPN rispondono ad infezioni normalmente caratterizzate da una risposta di tipo TH1 con una ridotta produzione di IL-12 e un'aumentata produzione di IL-10 (O'Regan AW. et al.,2000; Hashimoto M. et al.,2007).

OPN influenza anche la differenziazione dei linfociti T, favorendo la produzione di INF- $\gamma$  e l'espressione di CD40L (O'Regan AW. et al.,2000). Recentemente è stato dimostrato che OPN induce sopravvivenza dei linfociti T attivati, attraverso la regolazione dei fattori di trascrizione *Forkhead Box O3A*, (Foxo3a) e NF- $\kappa$ B (Hur EM. et al.,2007, Stromnes I. et al.,2007).

Per quanto riguarda la sua azione anti-infiammatoria, poco è conosciuto, ma si pensa che OPN eserciti un effetto anti-infiammatorio inibendo la produzione di ossido nitrico attraverso l'inibizione di iNOS (Guo H. et al.,2001; Takahashi F. et al.,2000). Inoltre, recentemente è stato dimostrato che OPN ha un effetto anti-infiammatorio durante la seconda esposizione all'antigene in corso di episodi allergici (Xanthou G. et al.,2007).

#### **4.3 Ruolo nei tumori.**

OPN svolge un ruolo fondamentale anche nello sviluppo dei tumori esercitando i suoi effetti pro-metastatici interagendo con le integrine e con CD44. L'interazione tra OPN e CD44 aumenta la formazione di foci, l'invasione e la tumorigenesi, attraverso la via del segnale mediata dalla protein chinasi Rac. Diversi studi hanno dimostrato che OPN protegge le cellule tumorali dall'apoptosi attivando la via di sopravvivenza di PI3 chinasi-Akt (Rangaswami H. et al.,2006).

OPN è iper-espressa in diversi tipi di tumore tra i quali tumore della mammella, della prostata, osteosarcomi, glioblastomi e melanomi (Rittling SR. et al.,2004). Topi *knock-out* per il gene di OPN mostrano una ridotta capacità di formare colonie in *soft agar* e una più lenta comparsa del tumore *in vivo*. Il silenziamento genico di OPN nel topo, mediante la tecnica della *RNA interference*, ha dimostrato una soppressione dello sviluppo dell'adenocarcinoma al colon sia *in vitro* che *in vivo* (Wai PT. et al.,2004).

#### **4.4 Ruolo nelle malattie autoimmuni.**

Il ruolo di OPN nelle malattie autoimmuni può essere in parte spiegato con la sua azione pro-infiammatoria, che prevede il reclutamento di leucociti nel sito di infiammazione e la polarizzazione in senso TH1. Lo studio svolto su topi transgenici per OPN (OPN<sup>+/+</sup>)

ha evidenziato un accumulo nella cavità peritoneale di un particolare tipo di linfociti denominati B1, che sono stati in passato associati alla produzione di autoanticorpi e iper-gammaglobulinemia (Masutani K. et al.,2001).

Elevati livelli di OPN sono stati rilevati nelle lesioni cerebrali di pazienti affetti da SM. Inoltre, il topo *knock-out* per OPN sviluppa una forma più lieve di EAE, modello sperimentale della SM, con ricadute meno frequenti rispetto al topo *wild-type* (Blom T. et al.,2003). OPN è una citochina chiave nell'EAE in quanto, ligando delle integrine  $\alpha V$ , regola l'attività degli oligodendrociti, principali responsabili del processo di rimielizzazione e favorisce la formazione della mielina (Zhao C. et al.,2008).

Nell'AR l'espressione di OPN è elevata nei fibroblasti, nei macrofagi e nei liquidi sinoviali, dove inibisce la produzione di ossido nitrico e di prostaglandina E<sub>2</sub>. Il topo *knock-out* per OPN mostra protezione dalla AR, confermando il ruolo di OPN nella patogenesi della malattia (Mishima R. et al.,2007).

Inoltre, un possibile ruolo di OPN nello sviluppo di malattie autoimmuni, potrebbe essere spiegato dal fatto che OPN è in grado di favorire lo sviluppo di un fenotipo TH17, coinvolto nella patogenesi della SM, del LES e dell'AR (Brucklacher-Waldert V. et al.,2009; Kwan BC. et al.,2009; Gaffen SL. et al.,2009).

I ruoli svolti da OPN nello sviluppo dell'autoimmunità nell'uomo sono molteplici (Bird L.,2007) e lo studio dei polimorfismi di OPN ha portato ad interessanti associazioni con alcune malattie autoimmuni.

Analisi genetiche, condotte nel nostro laboratorio, a carico del gene di OPN, hanno identificato alcuni polimorfismi che formano tre aplotipi (A, B e C). È stato dimostrato che i portatori degli aplotipi B e/o C presentano un rischio 8 volte maggiore di sviluppare ALPS, rispetto agli individui omozigoti AA (Chiocchetti A. et al.,2004). Nel caso della SM e del LES i portatori dei genotipi B e/o C presentano un rischio di sviluppare la malattia di 1.5 volte maggiore, rispetto ai portatori del genotipo AA (Chiocchetti A. et al.,2005; D'Alfonso S. et al.,2005).

## 5. Tissue Inhibitor of MetalloProteinase-1 (TIMP-1).

### 5.1 Caratteristiche strutturali.

La famiglia degli inibitori delle MMP è costituita da 4 membri (TIMP 1-4), i quali regolano il *turnover* delle proteine e il rimodellamento della matrice extra-cellulare, formando dei complessi stechiometrici reversibili 1:1 con le MMP. In particolare TIMP-1 inibisce in maniera specifica le MMP-3-7 e 9 (Avalos BR. et al.,1988; Visse R. et al.,2003).

Le MMP sono coinvolte in diversi processi biologici normali, come lo sviluppo embrionale, l'angiogenesi e il riparo delle ferite, ma sono coinvolte anche in diversi processi patologici come l'infiammazione e il cancro (Goetzl EJ. et al.,1996).

TIMP-1 è stato scoperto circa venti anni fa come attivatore e potenziatore della linea eritroide; infatti è in grado di stimolare la crescita e il differenziamento dei precursori eritroidi murini e di cellule leucemiche K562. Le sue proprietà di regolatore della crescita sono state in seguito dimostrate nei processi fibrotici (Lambert E. et al.,2003).

I geni che codificano per queste proteine sono localizzati sul cromosoma X in p11.1-p11.4, 17q25, 11q12.1-13.2 e 3p25, rispettivamente. Il gene che codifica per TIMP-1, in particolare, è costituito da 6 esoni per un totale di 3 Kb e codifica per una proteina di 206 amminoacidi di circa 23 KDa (Baker AH. et al.,2002).

TIMP-1 è una glicoproteina che presenta un dominio N- e C-terminale (di 125 e 65 amminoacidi, rispettivamente), contenente ciascuno sei residui di cisteina conservati, in grado di formare tre ponti di solfuro. L'estremità N-terminale presenta elevata omologia tra i quattro membri ed è sufficiente ad inibire le MMP. Questa sequenza contiene dei residui in grado di interagire con lo ione zinco del sito attivo delle MMP. Il dominio C-terminale invece è importante per l'interazione proteina-proteina e il legame alle pro-MMP, al fine di regolarne il processo di attivazione (Visse R. et al.,2003).

TIMP-1 è espresso dalle piastrine, dai monociti, dai neutrofili, dai linfociti T e B e dai fibroblasti; la sua espressione è stimolata da diversi agenti quali: TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , esteri del forbolo, retinoidi e prostaglandina E2 (Baratelli FE. et al.,2004). IL-10 stimola la produzione di TIMP-1 in particolare nei fibroblasti e nei macrofagi polmonari (Lacraz S. et al.,1995).

Recentemente è stato identificato il recettore di TIMP-1, mediante un sistema di doppio ibrido in lievito, nella molecola CD63 (Chirco R. et al.,2006).

## 5.2 TIMP-1 e CD63.

CD63 è un membro della famiglia delle tetraspannine, le quali interagiscono con diverse proteine quali integrine, immunoglobuline e recettori per fattori di crescita. Le tetraspannine controllano diversi processi biologici tra i quali: l'adesione, la migrazione cellulare e la formazione delle sinapsi (Levy S. et al.,2005). Le tetraspannine presentano 4 domini trans-membrana idrofobici, 2 anse extracellulari e 2 code intra-cellulari con residui N- e C- terminali. Una tetraspannina tipica presenta una sequenza di 200-300 amminoacidi con 4-8 cisteine extra-cellulari. CD63 è stata la prima tetraspannina caratterizzata, identificata come una glicoproteina delle piastrine e denominata *Platelet Glycoprotein 40* (Pltgp40), e successivamente riscontrata a livello di cellule di melanoma umano e quindi nota anche come *Melanom Antigen 491* (ME491). CD63 interagisce con differenti proteine quali: integrine ( $\alpha4\beta1$ ,  $\alpha3\beta1$ ,  $\alpha6\beta1$ ), altre tetraspannine (CD81, CD82), recettori di superficie (CD3, MHCII), chinasi, (Src, Lyn), proteine adattatrici (AP-2, AP-3) e altre proteine quali, TIMP-1. CD63 è presente a livello degli endosomi tardivi, delle vescicole secretorie e dei lisosomi noto come *Lisosome-Associated Membrane Protein* (LAMP-3) e anche a livello della membrana cellulare (Pols MS. et al.,2009).

CD63 è espresso sulla superficie delle cellule dendritiche ed è coinvolto nel processo di internalizzazione degli antigeni (Mantegazza A. et al.,2004).

È stato dimostrato, in cellule epiteliali umane, che TIMP-1 legando CD63 forma un complesso con l'integrina  $\beta1$  espressa sulla superficie cellulare. A questo segue l'attivazione di una via di sopravvivenza che, coinvolgendo le chinasi *Focal adesion kinase* (Fak) e Src, porta alla fosforilazione della proteina chinasi Akt/PKB. A questi eventi segue la fosforilazione di Bad, membro pro-apoptotico della famiglia di Bcl-2, che viene inattivato. In parallelo si attivano vie della trasduzione del segnale che coinvolgono fattori di sopravvivenza, quali *Extracellular Signal-Regulated Kinase 1,2* (Erk1,2) e *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPKs) (Jung KK. et al.,2006).

Uno studio recente riporta un'aumentata espressione di CD63 nei linfociti T attivati ed è stato ipotizzato che CD63 può funzionare da molecola co-stimolatoria e trasmettere segnali di sopravvivenza, quando opportunamente stimolato (Pfistershammer K. et al.,2004).

### 5.3 TIMP-1 e malattia.

TIMP-1 è implicato in diversi processi biologici quali rimodellamento tissutale, inibizione dell'angiogenesi, modificazioni morfologiche delle cellule della matrice, stimolazione della steroidogenesi e regolazione dell'apoptosi.

A livello del sistema nervoso centrale, TIMP-1 svolge un ruolo neuroprotettivo grazie al mantenimento della barriera emato-encefalica e in particolare inibisce gli influssi di calcio glutammato-dipendenti, che si verificano in seguito agli insulti esocitotossici (Ogier C. et al.,2005). È noto che gli stimoli pro-infiammatori come IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  o LPS inducono l'espressione di questa proteina negli astrociti e nelle cellule endoteliali di topi affetti da EAE (Crocker SJ. et al.,2006).

È stato dimostrato che l'iper-espressione di TIMP-1 nei neurinomi e nei meningiomi ne migliora la prognosi, probabilmente contrastando l'effetto della MMP-9 (Kachra Z, et al.,1999).

TIMP-1 svolge diverse funzioni biologiche indipendenti dalla sua capacità di inibire le MMP, tra le quali regolazione della proliferazione, sopravvivenza cellulare e differenziamento di diversi tipi cellulari.

Recentemente è stato identificato il ruolo di TIMP-1 nell'infiammazione dove rallenterebbe la degradazione dei tessuti controllando la proliferazione, la sopravvivenza e l'apoptosi cellulare (Chromek M. et al.,2004).

Il topo *knock-out* per TIMP-1 è vitale, anche se presenta ridotta fertilità. Inoltre, mostra maggiore resistenza alle infezioni, un aumento della risposta infiammatoria e dell'attività del complemento, rispetto al fenotipo *wild-type* (Jourquin J. et al.,2005).

Nelle cellule di carcinoma mammario umano è stato descritto un meccanismo anti-apoptotico mediato da TIMP-1 dovuto all'inibizione dell'espressione del recettore pro-apoptotico TRAIL (Li GR. et al.,1999; Okuyama S. et al.,2005). Questo meccanismo potrebbe favorire l'immunoelusione del tumore in quanto TRAIL favorisce l'attività citotossica, mediata dalle cellule NK attivate e dai linfociti T, contro le cellule tumorali. Sempre in questo tipo cellulare TIMP-1 riduce il tasso di crescita inducendo un arresto del ciclo cellulare nella fase G1, associato ad una *down-regulation* della ciclina D1 e all'*up-regulation* di p27<sup>KIP1</sup>, inibitore della chinasi associata alla ciclina, a cui segue una diminuzione della fosforilazione della proteina del retinoblastoma (pRb) (Taube ME. et al.,2006). A questi eventi segue un arresto del ciclo cellulare in fase G1.

È stato descritto il ruolo di TIMP-1 come fattore di crescita delle cellule di linfoma di Burkitt; in questo tipo di linfoma l'espressione di TIMP-1 induce l'espressione di Bcl-

X<sub>L</sub> e correla con un'elevata produzione di IL-10, la quale funziona da agente autocrino stimolando la proliferazione e la produzione di immunoglobuline da parte dei linfociti B (Guedez L. et al.,1998). Anche nei monociti e nei macrofagi è nota la capacità di TIMP-1 di indurre la produzione di IL-10. Sempre in cellule di linfoma di Burkitt il trattamento con TIMP-1 ricombinante riduce la suscettibilità all'apoptosi sopprimendo l'attività di caspasi 3 e sostenendo la sintesi del DNA (Guedez L. et al., 1998). In cellule di Reed-Sternberg del linfoma di Hodgkin, che producono TIMP-1, questo funziona da fattore di sopravvivenza (Oelman E. et al.,2002).

In cellule di carcinoma epiteliale, TIMP-1 induce l'espressione di Bcl<sub>2</sub>, noto inibitore della via intrinseca dell'apoptosi, in seguito ad un'attivazione costitutiva di Fak. Invece nei linfociti B, inibisce l'apoptosi inducendo l'espressione di Bcl-X<sub>L</sub> regolando l'espressione di CD40, CD77 e CD23 (Guedez L. et al.,2005).

È stato proposto un meccanismo che prevede la traslocazione nel nucleo di TIMP-1, il quale potrebbe controllare positivamente la trascrizione di geni anti-apoptotici (Gaudin P. et al.,2000; Ritter LM. et al.,1999).

Anche se non è ancora chiaro il ruolo di TIMP-1 nell'autoimmunità, dati in letteratura, anche se spesso contrastanti, hanno proposto il suo coinvolgimento in alcune malattie autoimmuni.

L'iper-espressione di TIMP-1 in cellule β del pancreas ha dimostrato una significativa riduzione dell'apoptosi di queste cellule, indotta da ripetute dosi di streptozotocina, indicando che TIMP-1 può essere un potenziale bersaglio per prevenire o migliorare il diabete mellito di tipo 1 (Jiang H. et al.,2007).

È stato dimostrato inoltre, che i PBMC di pazienti affetti da LES, secernono TIMP-1 e come questo gioca un ruolo importante nel ridurre l'infiammazione e il danno tissutale, inibendo la MMP-9 e aumentando i livelli di IL-10 (Matache C. et al.,2003).

In corso di SM la proteolisi della matrice extra-cellulare, con conseguente danno alla barriera emato-encefalica facilita l'infiltrazione dei linfociti T autoreattivi; in queste condizioni si ha un aumento delle MMP, accoppiato a livelli ridotti di TIMP-1, che contribuiscono ad una perdita di integrità della barriera emato-encefalica (Ozenci V. et al.,1999). I topi *knock-out* per TIMP-1 mostrano un fenotipo più grave di EAE rispetto ai topi *wild-type* (Thorne M. et al.,2009).

Dati di letteratura descrivono la presenza di autoanticorpi diretti contro TIMP-1 nel liquido sinoviale di pazienti affetti da AR. Questi anticorpi mostrano proprietà neutralizzanti e influenzano l'attività della MMP-9 (Bokarewa M. et al., 2005).

## ***SCOPO DELLA TESI***

Il lavoro svolto in questa tesi è partito dall'osservazione che OPN può avere un ruolo nello sviluppo dell'ALPS e di altre malattie autoimmuni intervenendo sia nella suscettibilità genetica sia nella patogenesi di queste malattie. Il lavoro ha seguito due linee di ricerca, sfociate in due articoli scientifici:

- 1) poiché OPN è prevalentemente una citochina pro-infiammatoria, ci siamo domandati se potesse avere un ruolo anche in quadri “iper-infiammatori” come la sepsi;
- 2) poiché un'analisi del trascrittoma linfocitario mediante *macroarray*, in una paziente affetta da una forma di ALPS, aveva evidenziato una iper-espressione sia di OPN sia di TIMP-1, ci siamo domandati se i due fattori avessero qualche relazione funzionale nell'ALPS.



# **ARTICOLO 1**

## **1. INTRODUZIONE**

La sepsi è caratterizzata da segni di infiammazione sistemica e le sue forme più gravi (SG e SS) sono una causa comune di morte fra i pazienti ricoverati nei reparti di terapia intensiva (Alberti C. et al.,2002). La sepsi si distingue dalla SIRS in quanto è indotta da fattori quali traumi e ischemia che causa danni ai tessuti. La discriminazione tra SIRS e sepsi è necessaria per stabilire la corretta terapia, dal momento che questa varia in presenza o meno di infezione (Leibovici L. et al.,1998). Quindi un'accurata diagnosi e la possibilità di discriminare tra sepsi, SIRS e SG/SS possono determinare la prognosi. Tuttavia, una diagnosi precoce di sepsi non risulta semplice anche per la mancanza di segni clinici e biomarcatori validati.

La patogenesi della SIRS e della sepsi non sono ben definite, anche se un ruolo chiave è attribuibile ad un'infiammazione sistemica con eccessiva produzione di citochine pro-infiammatorie come, TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 da parte di differenti tipi cellulari, quali monociti-macrofagi e cellule endoteliali. Antagonisti di IL-1 e TNF- $\alpha$  sono utilizzati per combattere l'infiammazione sistemica, ma spesso non portano ad un'efficace risoluzione (Cohen J. et al.,1996; Fisher CJ. et al.,1994).

OPN è una glicoproteina acida fosforilata coinvolta nelle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice cruciali nella risposta infiammatoria (Askar S. et al.,2000; Gravallesse M. et al.,2003). Agisce come componente della matrice extra-cellulare o come citochina solubile nei fluidi biologici, sia con funzioni pro-infiammatorie, favorendo la chemiotassi di monociti-macrofagi e modulando la funzione dei linfociti T, sia con funzioni anti-infiammatorie, inibendo la produzione di ossido nitrico da parte dei macrofagi e favorendo il riparo dei tessuti (Takahashi F. et al.,2004; Mishima R. et al.,2007).

I livelli sierici di OPN sono aumentati in malattie con infiammazione cronica o sistemica, come la malattia di Chron (Wong CK. et al.,2005), la SM (Chiocchetti A. et al.,2005) e la tubercolosi (Inomata S. et al.,2007); al contrario non è ben noto il suo ruolo nelle malattie con infiammazione acuta.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutarne i livelli nella SIRS e nella sepsi, al fine di indagare il suo coinvolgimento nella patogenesi di malattie con infiammazione acuta e identificare un suo possibile ruolo come *marker* di stato della malattia. A

proposito sono stati valutati i livelli sierici di OPN in 29 pazienti con SIRS, 27 con SG/SS e 57 controlli sani, dimostrando che OPN risulta significativamente aumentata nei pazienti rispetto ai controlli.

Mediante l'analisi della curva ROC risulta possibile suggerire l'impiego di OPN come *marker* per distinguere la SIRS dalla sepsi, dal momento che ha presentato un'accuratezza diagnostica pari a quella riportata per la PCT.

Negli stessi pazienti e controlli sono state dosate alcune citochine caratterizzanti i linfociti TH1 o TH2 ed è stata riscontrata una correlazione diretta tra i livelli di OPN e quelli di IL-6. Quindi, con lo scopo di identificare una correlazione funzionale tra OPN e IL-6, sono stati valutati i livelli trascrizionali e proteici di IL-6 in colture di monociti attivati o meno con LPS, stimolati con rOPN. I risultati indicano che OPN sembra essere coinvolta nella patogenesi della malattia in quanto è risultata in grado di indurre la produzione di IL-6, citochina chiave nello sviluppo della sepsi.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 PAZIENTI.

Lo studio è stato condotto su 56 pazienti (43 maschi e 13 femmine), ricoverati presso il reparto di terapia intensiva dell'Ospedale Maggiore della Carità di Novara. I pazienti presentavano segni clinico-laboratoristici di SIRS/Sepsi, SG o SS. La diagnosi di SIRS si è basata sulla presenza di almeno due dei seguenti criteri: 1) temperatura  $>38^{\circ}\text{C}$  o  $<36^{\circ}\text{C}$ ; 2) frequenza cardiaca  $>90$  battiti/minuto; 3) frequenza respiratoria  $>20$  atti respiratori/minuto o  $\text{PaCO}_2 <32$  mmHg; 4) conta dei linfociti  $>12000/\mu\text{l}$  o  $<4000 \mu\text{l}$  o presenza di forme immature con una frequenza  $>10\%$ . Sono stati classificati pazienti con SG quelli che presentavano disfunzione d'organo, e pazienti con SS quelli con persistente ipotensione, nonostante l'infusione di liquidi e il trattamento con farmaci vasoattivi.

Pertanto sono stati definiti due gruppi di pazienti: 29 pazienti con diagnosi di SIRS e 27 pazienti con diagnosi di SG/SS. Nello studio sono stati inclusi anche 56 controlli sani scelti in base alla provenienza geografica, all'età e al sesso. Inoltre, sono stati inclusi anche 21 pazienti con sepsi che durante la degenza in reparto hanno perso i criteri di inclusione dettati dalla *Consensus Conference of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*. Tale gruppo è rappresentativo dei pazienti in fase di risoluzione.

Per valutare oggettivamente la gravità clinica e poter confrontare i dati relativi al singolo paziente nel tempo esistono numerose scale il cui punteggio consente di esprimere un giudizio sulla gravità della condizione clinica del paziente e fornire indicazioni utili per l'orientamento terapeutico e prognostico. In questo studio sono state utilizzate due scale: la *Acute Physiology and Chronic Health Evolution (APACHE) II* e il *Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)*. L'assegnazione di tali punteggi è stata eseguita in cieco rispetto al dosaggio delle citochine. Queste scale mettono in relazione la risposta dell'ospite e la gravità della malattia. La scala SOFA si basa sulla valutazione del numero di organi coinvolti e della gravità della loro compromissione. La scala APACHE II è più completa, valuta 12 parametri fisiologici al momento dell'ammissione in reparto e tiene conto anche di fattori quali l'età del paziente o la presenza di stati morbosi concomitanti o pre-esistenti.

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

## **2.2 RACCOLTA DEI CAMPIONI.**

Tutti i campioni di sangue sono stati prelevati entro le prime 6 ore dal reclutamento dei pazienti. Per i pazienti analizzati durante la fase risolutiva, il prelievo ematico è stato eseguito il primo giorno dopo la perdita dei criteri di inclusione di SIRS o sepsi.

## **2.3 ISOLAMENTO E COLTURA DEI MONOCITI.**

Per la purificazione dei monociti CD14<sup>+</sup> a partire da PBMC, è stato utilizzato il kit commerciale (Milteniy-Biotec, Germania), il quale permette di effettuare una selezione negativa di queste cellule, sfruttando anticorpi biotinilati specifici per PBMC diversi dai monociti e anticorpi anti-biotina legati a biglie magnetiche. Le cellule marcate ritenute nella colonna sono state eliminate, mentre le cellule non marcate di nostro interesse sono state eluite. La purezza delle cellule è stata valutata per mezzo di analisi immunofenotipiche ed è risultata sempre superiore al 95%.

Per valutare la secrezione di IL-6, indotta da OPN,  $5 \times 10^5$  monociti sono stati seminati in piastre da 24 pozzetti in 1 ml di terreno di coltura in presenza o meno di LPS 25 ng/ml (*E. coli*, sierotipo 055:B5; Sigma Chemicals Co, St.Louis, MO) e di rOPN 0.1-0.5-1 µg/ml (R&D System, Minneapolis, MN). Dopo 6 ore, sono stati raccolti i surnatanti e dalle cellule è stato estratto l'mRNA. Per le analisi cinetiche i surnatanti sono stati raccolti dopo 6-24-48 ore. Il livello di endotossine presente nella preparazione di rOPN è inferiore a 1.0 EU/µg di rOPN, pari a 0.2 ng/ml. In alcuni esperimenti è stato anche aggiunto un anticorpo neutralizzante anti-rOPN alla dose di 10 µg/ml (R&D system, Minneapolis, USA).

## **2.4 DOSAGGIO DI OPN E DI IL-6.**

Le concentrazioni di OPN e di IL-6 nel siero dei pazienti, sono state misurate impiegando la metodica *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), seguendo il protocollo fornito dal produttore (Assays Designs, Inc., MI e Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, rispettivamente). La concentrazione minima dosabile è risultata essere di 3.6 ng/ml per OPN e inferiore a 1 pg/ml per IL-6. Dopo aver seguito il protocollo, si è proceduto alla lettura della piastra tramite lettore ottico Spectra Count con filtro a 450 nm (Bio-Rad, Hercules, CA). Infine, è stato utilizzato il programma I-smart per l'analisi dei dati e la costruzione della curva di regressione.

## **2.5 DOSAGGIO DELLE CITOCHINE DI TIPO TH1 E TH2.**

Per il dosaggio delle citochine è stato utilizzato il kit Human TH1/TH2 Cytometric Bead Array (CBA), commercializzato dalla ditta Becton Dickinson, che permette, tramite analisi citofluorimetrica, la rilevazione simultanea nello stesso campione delle citochine IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ; le concentrazioni minime dosabili per queste citochine sono rispettivamente di 2.6, 2.6, 2.4, 2.8, 2.8 e 7.1 pg/ml. Nella nostra analisi, 50  $\mu$ l di siero o di *standard* è stato miscelato con 50  $\mu$ l di biglie di cattura e 50  $\mu$ l di mAb-PE. I campioni sono stati acquisiti al FACScalibur (BD Pharmigen, NJ, USA).

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

Per gli esperimenti di Real-Time è stato isolato l'RNA totale da colture di monociti trattati o meno con differenti concentrazioni di rOPN per 6 ore, utilizzando il kit commerciale Nucleospin RNAII (Machery-Nagel, Germany). L'RNA (500 ng) è stato retrotrascritto con il kit Thermoscript<sup>TM</sup> RT PCR System (Invitrogen, Burlington, ON Canada). L'espressione di IL-6 è stata valutata con un saggio di espressione genica Assay on Demand (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA Assay No. Hs99999032\_m1). Il gene housekeeping *Hypoxanthine-guanine Phosphoribosil Transferase* (HPRT) (Assay No. Hs99999909\_m1) è stato utilizzato per normalizzare le variazioni del cDNA. La reazione è stata condotta nello strumento 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem, Foster City, CA). Ogni campione è stato analizzato in duplicato impiegando 0,5  $\mu$ l di cDNA diluito, 10  $\mu$ l di PCR master mix (Applied Biosystem) e 1  $\mu$ l di Assay on Demand mix. Il ciclo di PCR utilizzato prevede 10 min a 95<sup>0</sup>C, seguiti da 40 cicli a 95<sup>0</sup>C per 15 sec e a 60<sup>0</sup>C per 1 min. I risultati sono stati analizzati con il metodo delle curve *standard*.

## **2.7 DETERMINAZIONE DI NECROSI E DI APOPTOSI.**

Per valutare il livello di necrosi durante gli esperimenti tempo dipendente, è stato dosato il rilascio di lattato deidrogenasi (LDH) nel surnatante delle colture dopo 48 ore di trattamento, utilizzando il kit CytoTox-One<sup>TM</sup> Homogeneous Membrane Integrity (Promega, Madison, USA), seguendo le istruzioni. Nelle stesse condizioni le cellule sono state colorate con Blue di Tripiano per valutarne la vitalità.

## **2.8 CALCOLO DELLE CURVE Receiver Operator Characteristics (ROC).**

L'analisi dei dati mediante il calcolo della curva ROC e dell'area sotto la curva (AUC) ha permesso di calcolare la specificità e la sensibilità delle determinazioni. I seguenti parametri caratterizzano la curva ROC: 1) Le coordinate di ogni punto della curva sono il tasso di veri positivi pari alla sensibilità (y) e il tasso di falsi positivi, pari a 1 - specificità (x), in corrispondenza di un certo *cut-off*. 2) La pendenza della retta che congiunge un punto della curva con l'origine degli assi è uguale al rapporto di verosimiglianza del test positivo: sensibilità/(1-specificità). 3) Piccoli spostamenti lungo la curva informano sulle variazioni reciproche di sensibilità e specificità per piccole variazioni del *cut-off*. In questo senso è importante la pendenza locale della curva (es: grande pendenza significa buon incremento di sensibilità con piccola perdita di specificità). 4) I punti che giacciono sulla diagonale principale (bisettrice del grafico) corrispondono a un *cut-off* di utilità nulla, per i quali il rapporto di verosimiglianza è pari a 1 (diagonale di "indifferenza" del test). 5) Due punti della curva situati su rette parallele alla diagonale di "indifferenza", hanno la stessa somma di giuste classificazioni (sensibilità + specificità = costante) e di errate classificazioni (falsi positivi + falsi negativi = costante). 6) Pertanto: il punto più a nord-ovest della curva ROC corrisponde al miglior *cut-off*, nel senso di massimizzazione delle classificazioni corrette e di minimizzazione degli errori.

## **2.9 ANALISI STATISTICHE.**

L'analisi statistica è stata effettuata usando il test non parametrico di Mann-Whitney per il confronto dei dati non appaiati ottenuti dai differenti gruppi in studio (dosaggio di OPN e di citochine fra i diversi gruppi di pazienti e di controlli); il test di Wilcoxon per dati appaiati è stato usato per l'analisi dei dati ottenuti dalle colture monocitarie. Il confronto tra gruppi è stato valutato con il test Kruskal-Wallis. La correlazione tra le differenti variabili è stata analizzata calcolando l'indice di correlazione per ranghi di Spearman. La significatività statistica è stata attribuita per valori di  $p < 0.05$ . La sensibilità e la specificità sono state calcolate con la curva ROC e l'AUC. Sono stati impiegati i software statistici GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, California, USA) e MedCalc (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

### 3. RISULTATI

#### 3.1 Caratteristiche della popolazione di pazienti in studio.

Lo studio è stato condotto su 29 pazienti con diagnosi di SIRS e 27 con diagnosi di SG o SS e 56 controlli sani, con la stessa provenienza geografica, ed appaiati per sesso e per età. Inoltre, sono stati analizzati anche 21 pazienti in risoluzione, valutati il primo giorno in cui avevano perso i criteri di SIRS. Le caratteristiche cliniche e quelle microbiologiche dei pazienti sono schematizzate rispettivamente nella **Tabella I e II**. La gravità dei segni clinici è stata calcolata assegnando dei punteggi utilizzando il sistema APACHEII (Knaus WA. et al.,1985) o SOFA (Vincent JL. et al.,1996). I punteggi ottenuti con entrambi i sistemi sono significativamente differenti nei pazienti con SIRS e SG/SS ( $p < 0.0001$ ) (**Tabella I**).

**Tabella I. Caratteristiche cliniche e demografiche dei diversi gruppi**

	SIRS n=29	Sepsi Grave/Shock Settico n=27	Risoluzione n=21
Eta, anni <sup>a</sup>	48.2 ± 20.3	51.3 ± 20.8	51.7 ± 20.6
M/F <sup>b</sup>	22/7	21/6	14/6
APACHE II <sup>c</sup>	12 (6-16) <sup>d</sup>	20 (18-24)	9 (5-11)
SOFA <sup>c</sup>	4 (3-7) <sup>d</sup>	12 (10-14)	3 (2-5)
Mortalità <sup>b</sup>	3 (10%)	9 (33%)	0

**a:** i risultati mostrano la media ± la deviazione *standard*

**b:** i risultati sono mostrati come numeri assoluti; tra parentesi sono riportate le frequenze

**c:** i risultati sono mostrati come mediana; i *ranges* interquartili sono riportati tra parentesi

**d:** valori significativamente differenti da Sepsis Grave/Shock Settico

**Tabella II. Microbiologia dei pazienti con Sepsis Grave/Shock Settico**

Sito di infezione primitive	
Polmone	13 (48.1%) <sup>a</sup>
Addome	8 (29.6%)
Sangue	2 (7.4%)
Altro	4 (14.8%)
Agente eziologico	
Gram-negativi	14 (51.8%)
Gram-positivi	6 (22.2%)
Polibatterica	5 (18.5%)
Funghi	2 (7.4%)

**a:** i risultati sono mostrati come numeri assoluti, tra parentesi sono riportate le frequenze

### 3.2 I livelli di OPN sono aumentati nei pazienti con SIRS e SG/SS.

Al fine di indagare il ruolo di OPN nell'inflammazone sistemica sono stati dosati i livelli di OPN nel siero dei pazienti e dei controlli reclutati. I pazienti hanno mostrato livelli di OPN significativamente più elevati nei pazienti (mediana 1653 ng/ml), rispetto ai controlli sani (mediana 159 ng/ml,  $p < 0.0001$ ). Inoltre, i livelli di OPN sono significativamente più elevati nei pazienti con SG/SS (mediana 2031 ng/ml) rispetto a quelli con SIRS (mediana 1396 ng/ml,  $p < 0.0001$ ) (**Tabella III**). I valori di OPN sembrano essere legati alla prognosi in quanto sono significativamente più elevati nei pazienti che non sono sopravvissuti (mediana 2410 ng/ml), rispetto a chi è sopravvissuto (mediana 1552 ng/ml,  $p < 0.01$ ) e mostrano una correlazione diretta con la gravità clinica (APACHEII:  $r = 0,3858$ ,  $p < 0.01$ ; SOFA:  $r = 0,4759$ ,  $p < 0.001$ ). Durante la fase risolutiva, i livelli di OPN diminuiscono significativamente (mediana 438 ng/ml) rispetto a chi continua a manifestare la malattia ( $p < 0.01$ ), rimanendo comunque tre volte più elevati rispetto ai controlli sani (**Figura 1**).

**Tabella III. Livelli di OPN, IL-6, IL-10.**

	Controlli n=56	Pazienti n=56	SIRS n=29	SG/SS n=27
<b>OPN<sup>a</sup></b>	159 (104-208) <sup>b</sup>	1653 (1139-2440)	1396 (606-1704) <sup>d</sup>	2031 (1556-3557)
<b>IL-6<sup>a</sup></b>	5 (3-8) <sup>b</sup>	81 (39-199)	55 (29-105) <sup>d</sup>	130 (69-313)
<b>IL-10<sup>a</sup></b>	Non rilevabili	20 (5-156)	8 (4-45)	36 (7-197)

	Sopravvissuti n=44	Non Sopravvissuti n=12
<b>OPN<sup>a</sup></b>	1552 (966-2032) <sup>c</sup>	2410 (1673-4810)
<b>IL-6<sup>a</sup></b>	72 (29-164)	107 (72-357)
<b>IL-10<sup>a</sup></b>	6 (3-45)	34 (22-157)

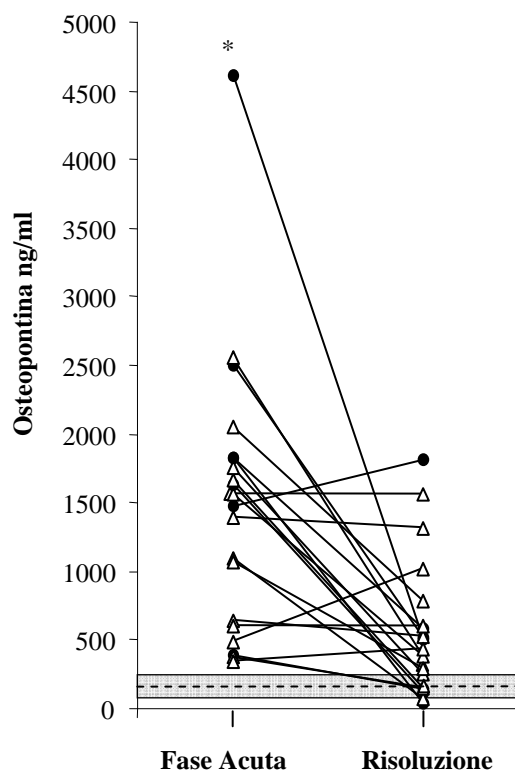
**a:** media dei valori di OPN (ng/ml), di IL-6 (ng/l) e di IL-10 (ng/l); tra parentesi sono riportati i *ranges* interquartili

**b:** livelli significativamente differenti tra tutti i pazienti rispetto ai controlli,  $p < 0.001$ , Mann Whitney

**c:** livelli significativamente differenti tra chi sopravvive rispetto a chi non sopravvive,  $p < 0.001$ , Mann Whitney

**d:** livelli significativamente differenti tra i pazienti con SG/SS,  $p < 0.001$ , Mann Whitney



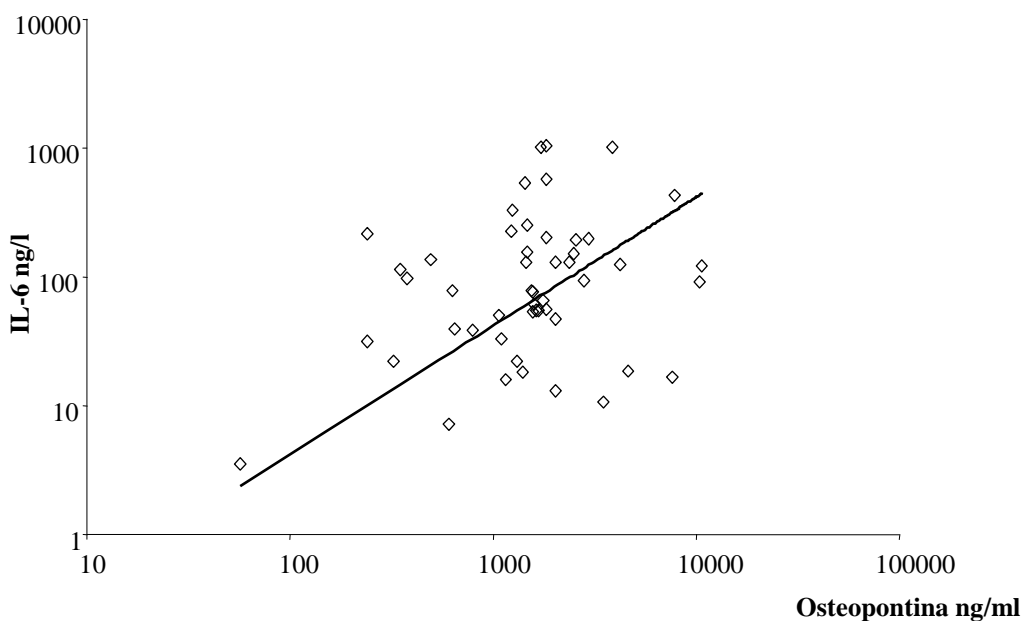


**Figura 1: Livelli sierici di OPN durante la fase di risoluzione.** Livelli sierici di OPN nei pazienti con SIRS (triangoli) o con SG/SS (cerchi) valutati durante la fase acuta o di risoluzione della malattia. Il box in grigio rappresenta la mediana (linea tratteggiata) e il 25° e il 75° percentile dei controlli. \*  $p < 0.05$ , test di Wilcoxon.

### 3.3 Profilo citochinico.

Nella patogenesi della sepsi e della SIRS, un ruolo chiave è giocato dalle citochine pro- e anti-infiammatorie. Per delineare un quadro più completo del comportamento di OPN nell'ambito della risposta citochinica, sono stati dosati i livelli sierici di IL-6 e TNF- $\alpha$  (citochine dell'infiammazione acuta), IL-2 e IFN- $\gamma$  (citochine TH1) e IL-4, IL-5 e IL-10 (citochine TH2) nei pazienti e nei controlli. Pochi pazienti hanno mostrato livelli rilevabili di TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-5 e nessuna differenza è stata riscontrata rispetto ai controlli (dati non mostrati). Al contrario, i livelli di IL-6 (mediana 81 ng/l,  $p < 0.0001$ ) e di IL-10 (mediana 20 ng/l,  $p < 0.0001$ ) sono significativamente più elevati nei pazienti (**Tabella III**). Inoltre, i dati ottenuti mostrano che IL-6, ma non IL-10, è significativamente più elevata nei pazienti con SG/SS rispetto a quelli con SIRS (mediana 130 ng/l vs 55 ng/l,  $p < 0.01$ ), mentre i livelli di entrambe le citochine sono più elevati nei pazienti che non sono sopravvissuti rispetto ai sopravvissuti (**Tabella III**), tuttavia solo OPN mostra una significatività statistica. Infine, i livelli di OPN e di IL-6

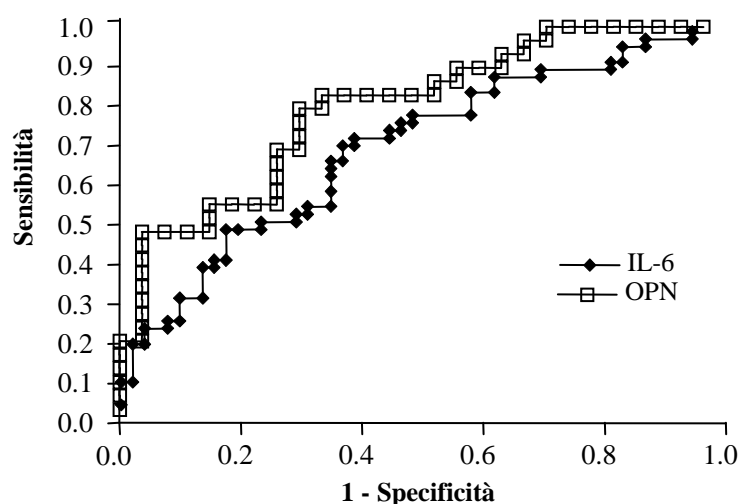
mostrano una correlazione diretta significativa ( $r=0,3033$ ,  $p<0.05$ ) (**Figura 2**), ma non sono correlati con i livelli di IL-10 (dati non mostrati).



**Figura 2:** Correlazione tra i livelli sierici di OPN e di IL-6. I livelli di OPN e di IL-6 mostrano una correlazione diretta significativa nei pazienti con SIRS e SG/SS ( $r=0.3033$ ;  $p<0.05$ ).

### 3.4 OPN e IL-6 come *markers* di infiammazione e sepsi.

Vista la significativa differenza dei livelli di OPN e di IL-6 nei pazienti con SG/SS rispetto a quelli con SIRS, è stata utilizzata una curva ROC per verificare la capacità di queste due citochine di discriminare i pazienti con SG/SS da quelli con SIRS (**Figura 3**). L'AUC è 0.796 (95% IC=0.667-0.892;  $p=0.0001$ ) per OPN e 0.727 (95% IC=0.591-0.837;  $p=0.0009$ ) per IL-6. Per OPN, il valore di *cut-off* ottimale per discriminare fra pazienti con SG/SS e pazienti con SIRS è risultato essere pari a 1708 ng/ml. Utilizzando tale valore come soglia è stato ottenuto un valore di sensibilità del 70% e uno di specificità del 79% con un valore di verosimiglianza positivo (LR+) di 3.40.



**Figura 3: Curve ROC.** La receiver operator characteristics curve valuta l'accuratezza dei livelli di OPN e di IL-6 nel differenziare i pazienti con SIRS da quelli con SG/SS. L'area sotto la curva è 0.796 (95% IC=0.667-0.892;  $p=0.0001$ ) per OPN e 0.727 (95% IC=0.591-0.837;  $p=0.0009$ ) per IL-6.

### 3.5 OPN induce la secrezione di IL-6 nei monociti.

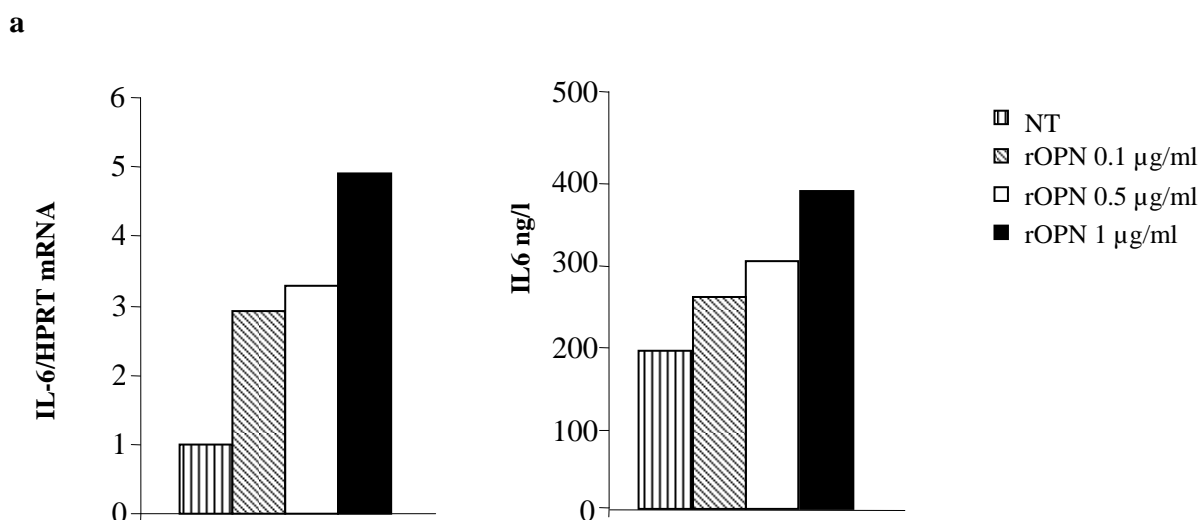
La correlazione diretta tra i livelli di OPN e di IL-6 nei pazienti ha suggerito la possibilità che la loro produzione potesse essere legata. Quindi è stato testato l'effetto di rOPN sulla secrezione di IL-6 da parte di monociti in esperimenti dose- e tempo-dipendenti.

Inizialmente è stata effettuata una titolazione dell'effetto di rOPN trattando i monociti con 0.1-0.5-1  $\mu\text{g/ml}$  di rOPN. Dopo sei ore di trattamento sono stati dosati i livelli di IL-6 nei surnatanti delle colture mediante ELISA, mentre le cellule sono state utilizzate per l'estrazione dell'mRNA, al fine di valutare i livelli trascrizionali di IL-6 mediante Real-Time PCR. I risultati ottenuti mostrano che i livelli sia di mRNA sia proteici di IL-6 aumentano in risposta al trattamento con rOPN in maniera dose dipendente (**Figura 4a**).

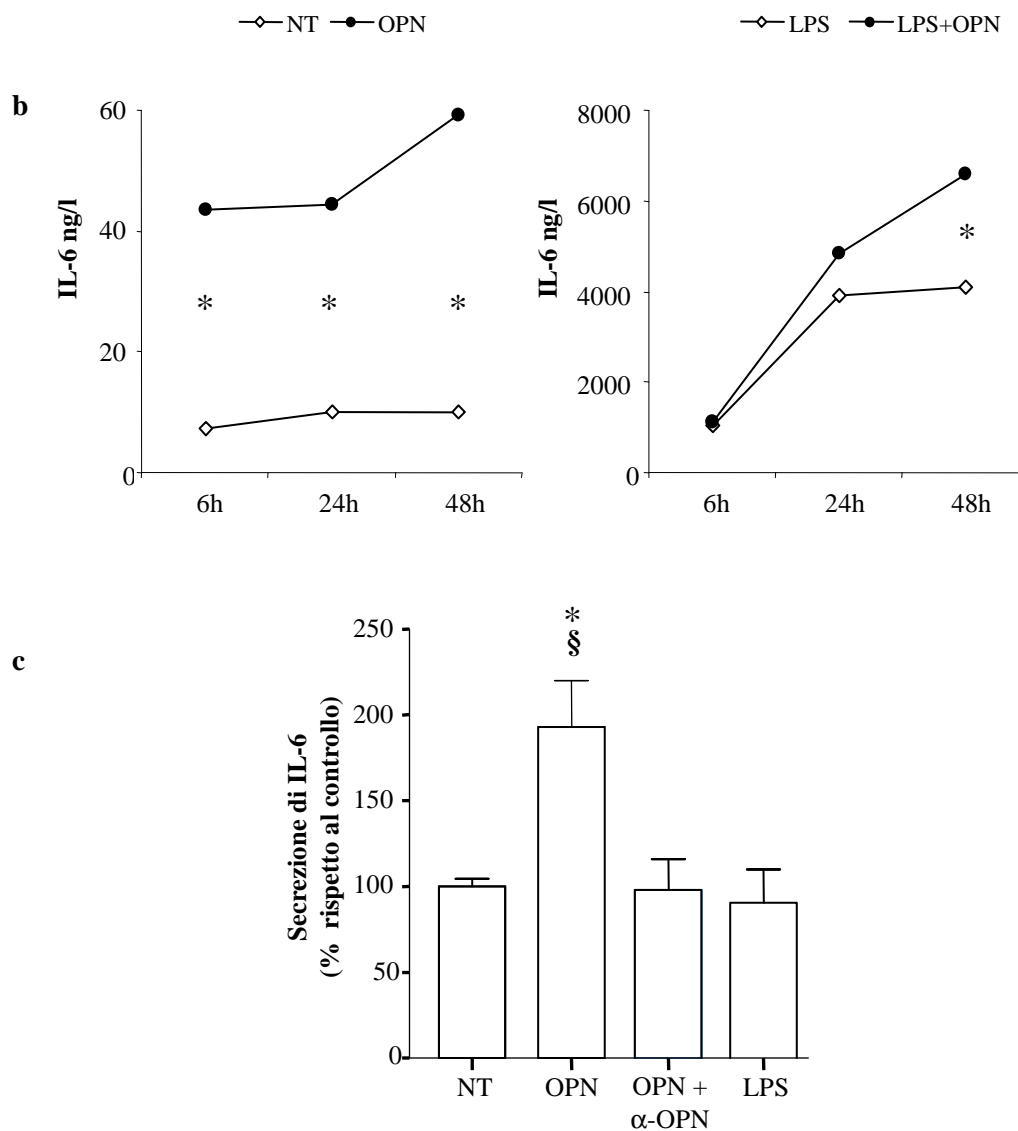
Successivamente sono stati condotti degli esperimenti tempo dipendenti per valutare l'effetto di rOPN sulle secrezione di IL-6 in presenza o meno di LPS. I risultati mostrano che il trattamento con LPS induce elevati livelli di IL-6, rilevabili già dopo 6 ore di trattamento, i quali aumentano ulteriormente dopo 24 e 48 ore; questa secrezione di IL-6 è significativamente aumentata dal trattamento con rOPN solo dopo 48 ore. In assenza di LPS, rOPN induce bassi livelli di IL-6, ma rilevabili già dopo 6 ore di stimolazione (**Figura 4b**). L'effetto di rOPN non è dovuto ad una mortalità differenziale

dei monociti nel tempo, in quanto il dosaggio del rilascio di LDH e la conta cellulare con Blue di Tripiano, hanno rilevato lo stesso tasso di mortalità cellulare in tutte le condizioni sperimentali (dati non mostrati).

Infine, è stata valutata la specificità dell'effetto indotto da rOPN per escludere che l'aumento di IL-6 fosse dovuto alla minima contaminazione di endotossine presenti nella preparazione di rOPN (inferiore a 0.2 ng di endotossine/ $\mu$ g di rOPN). Quindi è stata valutata la secrezione di IL-6 indotta da rOPN in presenza o meno di un anticorpo anti-OPN neutralizzante. I risultati ottenuti mostrano che l'aggiunta di un anticorpo neutralizzante OPN abroga la secrezione di IL-6 indotta da OPN (**Figura 4c**). Inoltre, è stata valutata la secrezione di IL-6 in presenza della dose massima di endotossine contaminanti la preparazione di rOPN (0.2 ng/ml). I risultati permettono di dimostrare che queste basse dosi di LPS non inducono la secrezione di IL-6 e che quindi l'effetto osservato è specifico e non è dovuto alle endotossine contaminanti.



**Figura 4a:** OPN induce la secrezione di IL-6 nei monociti. IL-6 è indotta da rOPN in maniera dose dipendente dopo 6 ore di trattamento, sia a livello di mRNA (pannello di sinistra) sia a livello proteico (pannello di destra). I valori relativi all'mRNA di IL-6 sono stati normalizzati a quelli del gene HPRT e i risultati sono espressi come aumento relativo rispetto ai livelli delle cellule non trattate.



**Figura 4b: OPN induce la secrezione di IL-6 nei monociti.** Produzione di IL-6 da parte di monociti non trattati (pannello di sinistra) o trattati con 25 ng/ml di LPS (pannello di destra) per 6-24-48 ore, in presenza o meno di rOPN 1  $\mu$ g/ml. La significatività statistica è stata determinata con il test Wilcoxon.

\*  $p < 0.05$ . **Figura 4c:** Livelli di IL-6 in monociti non trattati (NT), trattati con rOPN 1  $\mu$ g/ml, trattati con rOPN e un anticorpo neutralizzante OPN 10  $\mu$ g/ml o con LPS 0.2 ng/ml. La produzione di IL-6 senza OPN è stata normalizzata al 100%. \*  $p < 0.01$  rispetto ai monociti trattati con LPS o NT; §  $p < 0.01$  rispetto ai campioni trattati con l'anticorpo neutralizzante OPN ( $\alpha$ -OPN), utilizzando il test Kruskal-Wallis.

#### **4. DISCUSSIONE**

Il dato principale ottenuto in questo lavoro è che i livelli sierici di OPN sono aumentati nei pazienti con infiammazione sistemica associata o meno ad infezione e che i livelli sierici di OPN correlano con quelli di IL-6. Inoltre questo lavoro, suggerisce che il dosaggio di OPN potrebbe essere un valido strumento diagnostico per discriminare la SIRS dalla sepsi e che OPN possa svolgere un ruolo nella patogenesi dell'infiammazione sistemica, attraverso la sua capacità di promuovere la secrezione della citochina pro-infiammatoria IL-6 da parte dei monociti.

OPN è un mediatore chiave in diversi processi cellulari sia fisiologici sia patologici, quali l'immunità cellulo-mediata, l'infiammazione, la progressione tumorale con il processo di metastatizzazione e la sopravvivenza cellulare (Jain S. et al.,2007). Sebbene inizialmente si fosse ipotizzato che OPN mediasse principalmente il rimodellamento osseo e la riparazione dei tessuti (Gravallese EM. et al.,2003), recentemente è stato evidenziato il suo coinvolgimento anche nell'infiammazione cronica, durante la quale sostiene la risposta di tipo TH1 (Rollo EE. et al.,1996). Inoltre, il nostro laboratorio ed altri gruppi hanno dimostrato un incremento dei livelli di OPN in malattie infiammatorie croniche quali la SM (Vogt MH. et al,2003), il LES (Wong CK. et al.,2005), le infezioni da micobatteri (Inomata S. et al.,2005; Nau GJ. et al.,2000) e in casi di cirrosi epatica insorta su infezione cronica da HBV (Zhao L. et al.,2008). In tutte queste malattie infiammatorie i livelli di OPN sembrano correlare con la gravità della malattia dal momento che si registra un aumento dei livelli con il peggiorare del quadro clinico.

In questo studio è stato indagato il ruolo di OPN nell'infiammazione sistemica acuta ed è stato dimostrato che i livelli di OPN sono aumentati di oltre 10 volte nei pazienti con SIRS o sepsi rispetto ai controlli sani. Inoltre, essi sono più elevati nei pazienti con SIRS rispetto a quelli con SG/SS e diminuiscono in caso di risoluzione di entrambi le condizioni.

Il dosaggio dei livelli di OPN potrebbe essere utile per monitorare lo stato e la progressione di queste forme di infiammazione sistemica. Infatti, la maggior parte dei pazienti con sepsi, ovvero 17/27 (63%) presenta livelli di OPN più alti del 75° percentile dei valori ottenuti nei pazienti con SIRS (1704 ng/ml). L'accuratezza diagnostica di OPN nel discriminare tra SIRS e SG/SS, valutata mediante il calcolo della curva ROC, è confrontabile con quella presentata in una recente metanalisi riguardante la PCT (Tang BM. et al.,2007) e IL-6 (Harbarth S. et al.,2001), che sono i marcatori sierici attualmente più utilizzati per monitorare l'evoluzione dei quadri di infiammazione sistemica. Il ruolo

della PCT nella risposta immunitaria è poco chiaro, ma sembra che i livelli sierici di tale proteina correlino con la gravità e con la presenza di infezione nella sepsi. Tuttavia, seppur molto promettente, il dosaggio di PCT non sembra in grado di assicurare una diagnosi definitiva di sepsi (Resch B. et al., 2003).

IL-6 è una citochina pro-infiammatoria ritenuta essere una citochina chiave nella patogenesi della sepsi in quanto è in grado di promuovere l'infiammazione e la sintesi di proteine di fase acuta. E' fra le citochine più utilizzate come marcatore per la diagnosi di SIRS e di sepsi e numerosi studi hanno documentato che alti livelli di tale citochina correlano con l'infezione settica nell'adulto. Tuttavia, diversi dati in letteratura indicano che non sembra un marcatore migliore rispetto alla PCT nella diagnosi di sepsi visti i bassi valori di sensibilità e specificità. Quindi, date le differenti problematiche riscontrate dall'utilizzo di questi *markers*, il dosaggio di OPN potrebbe rivelarsi un utile mezzo per integrare le informazioni fornite da PCT e da IL-6.

In questo lavoro si è cercato inoltre di valutare il ruolo svolto da OPN nella patogenesi dell'infiammazione sistemica in presenza o assenza di infezione. La correlazione diretta tra i livelli sierici di OPN e quelli di IL-6 nei pazienti con SIRS e nei pazienti con SG/SS suggerisce che tali citochine possono essere correlate anche da un punto di vista funzionale. Questo dato è supportato dal fatto che la correlazione è presente anche nei soggetti sani di controllo (dato non mostrato). La secrezione di OPN e di IL-6 possono essere controllate dagli stessi stimoli induttori. Infatti, i geni che codificano per queste citochine, utilizzano lo stesso fattore trascrizionale *Nuclear Factor-IL-6* (NF-IL-6), attivato durante l'infiammazione acuta e l'attivazione macrofagica (Akira S. et al., 1990). I nostri esperimenti *in vitro* dimostrano che OPN è in grado di promuovere la secrezione basale di IL-6 da parte dei monociti. È interessante notare che OPN aumenta la secrezione di IL-6 in presenza di LPS (condizione che mima un'infezione batterica severa), ma anche in sua assenza. Dal momento che la preparazione di rOPN impiegata presenta basse dosi di endotossine contaminanti, questi risultati non dimostrano formalmente che OPN è di *per se* in grado di indurre la secrezione di IL-6 nei monociti, ma indicano che è in grado di supportare una risposta infiammatoria sistemica in presenza di ridotte quantità di questi agenti.

L'importanza dell'interazione funzionale fra OPN e il sistema monocito/macrofagico è evidenziato dai dati ottenuti sui topi *knock-out*. Infatti, è stato dimostrato in questo modello murino che OPN ha un ruolo chiave nel reclutare i macrofagi nel sito dell'infezione e nel supportarne la sopravvivenza (O'Reagan AW. et al., 2001). I topi

OPN<sup>-/-</sup> presentano una riduzione dell'infiltrazione macrofagica ed un aumento del tasso di morte apoptotica a livello del tessuto ischemico, durante l'insufficienza renale acuta (Persy VP. et al.,2003). Inoltre, essi mostrano un'aumentata suscettibilità alle infezioni da micobatteri, nelle quali i macrofagi giocano un ruolo chiave (Nau GJ. et al.,1999).

Questo lavoro non fornisce alcuna indicazione circa la fonte di OPN nella SIRS/sepsi; a livello della lesione o dei tessuti infiammati vi sono molte altre cellule produttrici di OPN in grado di supportarne i livelli plasmatici, quali cellule dell'endotelio vascolare, macrofagi, cellule muscolari lisce, cellule NK e linfociti T attivati.

In conclusione, i dati presentati in questo articolo mostrano che i livelli di OPN sono fortemente indotti durante la SIRS e la sepsi e suggeriscono che essi correlano con la gravità della condizione clinica. È stato inoltre dimostrato che OPN è in grado di indurre, *in vitro*, la secrezione di IL-6 da parte di monociti e di potenziare tale secrezione indotta da LPS. Questo suggerisce un ruolo centrale di OPN nella patogenesi dell'infiammazione sistemica. Per tali ragioni OPN sembra essere uno strumento promettente per la diagnosi e il monitoraggio della SIRS/Sepsi.



# **ARTICOLO 2**

## **1. INTRODUZIONE**

Questo lavoro valuta il coinvolgimento di TIMP-1 nella patogenesi dell'ALPS/DALD. L'ALPS è una malattia autoimmune ereditaria caratterizzata da 1) accumulo policlonale di linfociti nella milza e nei linfonodi con linfadenomegalia e/o splenomegalia, 2) sviluppo di manifestazioni autoimmuni che coinvolgono prevalentemente le cellule del sangue, 3) espansione di linfociti TCR  $\alpha\beta$  positivi DN per CD4 e CD8 nel sangue periferico e nei tessuti linfoidei, 4) ridotta funzione del recettore di morte Fas, coinvolto nello spegnimento della risposta immunitaria (Blasing JJ. et al.,2001; Straus SE. et al.,1999). Inoltre, i pazienti con ALPS sono predisposti a sviluppare linfomi in età adulta. La maggior parte dei casi di ALPS sono dovuti a mutazioni a carico del gene Fas (ALPS tipo Ia), mentre un piccolo numero di pazienti presenta mutazioni del gene FasL (ALPS tipo Ib) o caspasi 10 (ALPS tipo II). Inoltre una percentuale sostanziale di pazienti presenta difetti della morte cellulare indotta da Fas (FICD), ma il gene mutato non è noto (ALPS tipo III) (Campagnoli MF. et al.,2006; Martin DA. et al.,1999). Nel nostro laboratorio è stato descritto un quadro clinico sovrapponibile all'ALPS in presenza di difetto funzionale di Fas ma in assenza dell'espansione dei linfociti T DN e delle mutazioni dei geni Fas, FasL o caspasi 10 (Dianzani U. et al.,1997; Ramenghi U. et al.,2000). Questa malattia è stata provvisoriamente chiamata Malattia Autoimmune Linfoproliferativa di Dianzani (DALD) da McKusick. In aggiunta alle mutazioni causali che inibiscono la funzione di Fas, lo sviluppo dell'ALPS può essere influenzato dal *background* genetico. Questo spiega la penetranza incompleta della maggioranza delle mutazioni causali. Questa influenza è stata dimostrata nel modello animale dell'ALPS, rappresentato dai topi *MRLlpr/lpr* e *MRLgld/gld*, portatori di mutazioni dei geni Fas e FasL rispettivamente; infatti queste mutazioni causano un quadro clinico più grave nel ceppo MRL rispetto ad altri ceppi, come il Balb/c (Rieaux-Laucat F. et al.,1995). Nell'uomo un ruolo predisponente allo sviluppo dell'ALPS/DALD può essere svolto dalle variazioni del gene di OPN. Infatti, lavori precedenti hanno dimostrato che i pazienti con DALD presentano maggiori livelli di OPN nel siero rispetto ai controlli sani e che questo correla con particolari varianti del gene di OPN che aumentano di 8 volte il rischio di sviluppare DALD. Queste varianti geniche sarebbero direttamente responsabili degli elevati livelli di OPN attraverso la stabilizzazione del relativo mRNA (Chiocchetti A. et al.,2004). E' interessante notare che elevati livelli di OPN sono stati

descritti anche nei topi *MRL<sup>lpr/lpr</sup>*. Gli elevati livelli di OPN potrebbero favorire lo sviluppo della malattia in quanto inibiscono la morte cellulare indotta dall'attivazione (AICD), un meccanismo di spegnimento della risposta immunitaria che si affianca a quello mediato da Fas (Chiocchetti A. et al.,2004; Mateo V. et al.,2007).

L'attenzione su OPN è stata inizialmente indotta da un'analisi mediante un *macroarray* a cDNA che ha permesso di confrontare l'espressione di geni coinvolti nell'apoptosi e nella proliferazione linfocitaria di una paziente con DALD e di suo fratello sano. Oltre a OPN, quest'analisi ha anche evidenziato nel paziente un'iper-espressione di TIMP-1 appartenente a una famiglia di proteine che funzionano come inibitori specifici delle MMP (Visse R. et al.,2003). TIMP-1, oltre a funzionare da inibitore delle MMP, è in grado di inibire l'apoptosi delle cellule di linfoma di Hodgkin e di indurre l'espressione della proteina anti-apoptotica BclX<sub>L</sub> in cellule di linfoma di Burkitt (Guedez L. et al.,2005; Guedez et al.,1998). Inoltre, TIMP-1 ricombinante inibisce la citotossicità cellulo-mediata, la quale svolge un ruolo nell'AICD dei linfociti attivati (Guedez et al.,1998).

Queste premesse ci hanno indotto ad indagare il ruolo di TIMP-1 nello sviluppo dell'ALPS/DALD. I risultati di questo studio hanno dimostrato che i livelli sierici di TIMP-1 sono più elevati sia nei pazienti con DALD sia in quelli con ALPS rispetto ai controlli sani. Il sequenziamento del gene di TIMP-1 ha dimostrato che questa differenza non è riconducibile a variazioni di questo gene. Invece si è dimostrato che rOPN induce l'espressione di TIMP-1 da parte dei monociti, *in vitro*. Inoltre è stato anche dimostrato che TIMP-1 inibisce sia la morte cellulare indotta da Fas (FICD), sia quella indotta dalla ristimolazione del TCR (AICD) dei linfociti T *in vitro*. Questi dati suggeriscono pertanto che TIMP-1 sia coinvolto nello sviluppo dell'ALPS/DALD e che la sua azione sia mediata da un effetto inibitorio sull'apoptosi linfocitaria.

## **2. MATERIALI E METODI**

### **2.1 PAZIENTI.**

In questo lavoro abbiamo analizzato 32 pazienti (10 femmine e 22 maschi), di cui 11 con ALPS e 21 con DALD, provenienti dal Dipartimento di Pediatria dell'Università di Torino. Inoltre, abbiamo analizzato 50 controlli sani confrontabili con i pazienti per sesso ed età (17 femmine e 33 maschi), reclutati presso il dipartimento di Scienze Mediche dell'Università di Novara.

La diagnosi di malattia dei pazienti con ALPS è basata sui seguenti criteri: 1) emocitopenia autoimmune che coinvolge una o più linee di cellule ematiche, 2) linfadenopatia cronica non maligna (aumento di almeno 2 cm del diametro di due o più linfonodi) e/o splenomegalia, 3) difetto di apoptosi indotta da Fas *in vitro* e 4) presenza di mutazioni nei geni di Fas, FasL o caspasi10 e/o espansione di linfociti T DN (>2%) nel sangue periferico. I pazienti con DALD presentano i primi 3 criteri, ma non il quarto. I campioni di siero e di sangue sono stati prelevati dai controlli e dai pazienti, con consenso informato scritto. Lo studio è stato condotto secondo le linee guida proposte dalla commissione etica locale.

### **2.2 ANALISI CON MACROARRAY.**

Due tipi di membrane per *macroarray* sono state acquistate da Sigma-Genosys (London, UK): Panorama Human Apoptosis Gene Arrays (PRAP0002) e Panorama Human Cytokine Gene Arrays (PRCK0002). Per la preparazione delle due sonde di cDNA, sono stati utilizzati 2 µg di RNA totale, estratto da PBMC tenuti in coltura per 6 giorni in presenza di PHA (Fitoematoagglutinina) (1 µg/ml) e IL-2 (10 U/ml) e retrotrascritto secondo le indicazioni fornite dal kit. Le membrane sono state pre-ibridizzate per 2 ore a 65<sup>0</sup>C, denaturate, marcate con <sup>32</sup>P e incubate a 65<sup>0</sup>C per 15 minuti. In seguito le membrane sono state lavate per 2 volte con 0.2X SSC (soluzione di sodio cloruro e sodio citrato)/0.1% SDS (sodio dodecil-solfato) a 65<sup>0</sup>C per 30 minuti e analizzate al Phosphoimage scanner (BioRad, Hecules, CA).

### **2.3 ANALISI DEL GENE DI TIMP-1.**

200 ng di DNA genomico sono stati utilizzati come stampo per l'amplificazione utilizzando i seguenti primers:

2F (5'-AAACTCTCCCAACTCCTCTAAAC-3')

2R (5'-GAGGTAAGTGCCATGGTGAGC-3')

3F (5'-TTGGCTCATGCAGTCCATTTGA-3')

4R (5'-CTCGTGGTTGCTAGGCCGCG-3')

5F (5'-CGCGGCCTAGCAACCACGAG -3')

5R (5'-GGCTCAGGAACGGGGAGTGG -3')

6F (5'-GAGAGGAAGTTCTGCTCCACG-3')

6R (5'-GCAGGCTTCAGCTTCCACTCC-3')

3'F (5'-TTCCTATACTGATTCCTAATTG-3')

3'R (5'-CCTTCCAAGTTGGTCAGAGG-3')

Il prodotto di PCR è stato purificato con gli enzimi Exo-Sap e 60 ng del prodotto di purificazione sono stati sequenziati. Il sequenziamento è stato condotto impiegando il reagente PRISM™BigDye Terminator (Applied Biosystem, Foster City, CS) in un sequenziatore automatico (Applied Biosystem 3100 (Genetic Analyzer). Le sequenze sono state analizzate con il software ABI Prism® DNA 3.7 (Applied Biosystem).

#### **2.4 SEPARAZIONE SU GRADIENTE DI CELLULE MONONUCLEATE DA SANGUE PERIFERICO.**

Per la separazione dei PBMC, è stato utilizzato sangue di donatori sani ottenuto da una sacca di sangue concentrato (Buffy coat), proveniente dal centro trasfusionale AVIS di Novara. Il sangue è stato diluito con PBS, stratificato su Ficoll-Hypaque (Lympholyte-H, Cederlane Laboratories Hornby, Ontario, Canada) e centrifugato a 1800 rpm per 30 minuti. In seguito sono stati recuperati i PBMC, lavati con PBS e centrifugati una seconda volta a 1500 rpm per 10 minuti. Le cellule sono state risospese in terreno RPMI 1640 (Gibco, New York, USA) addizionato di 1% L-Glutamina, Antibiotici (Penicillina, Streptamicina, Gentamicina) e 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco, New York, USA).

#### **2.5 PURIFICAZIONE DI LINFOCITI T CD4<sup>+</sup> O CD8<sup>+</sup>, LIFOCITI B CD19<sup>+</sup> E MONOCITI CD14<sup>+</sup>.**

Per la purificazione dei linfociti T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> e dei monociti CD14<sup>+</sup> è stato utilizzato un kit commerciale (Milteniy-Biotec, Germany), il quale permette di effettuare una selezione negativa delle cellule desiderate, sfruttando anticorpi biotinilati e anticorpi anti-biotina legati a biglie magnetiche. Le cellule marcate ritenute nella colonna sono

state eliminate, mentre le cellule non marcate di nostro interesse sono state eluite. La purezza delle cellule è stata valutata per mezzo di analisi immunofenotipiche ed è risultata sempre superiore al 95%. I linfociti B sono stati purificati dalle tonsille di bambini sottoposti a tonsillectomia utilizzando un gradiente discontinuo di Percoll come già descritto (Dono MV. et al.,1996). La morte cellulare spontanea è stata valutata in ogni condizione sperimentale mediante conta con Blue di Tripiano e rilascio di LDH seguendo le istruzioni del Kit (Cito-Tox One, Promega Madison, USA).

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

Per gli esperimenti di Real-Time è stato isolato l'RNA totale da colture di PBMC, utilizzando il kit commerciale Nucleospin RNAII (Machery-Nagel, Germany). L'RNA (500ng) è stato retroscritto con il kit ThermoScript™ RT PCR System (Invitrogen, Burlington, ON Canada). L'espressione di TIMP-1 è stata valutata con un saggio di espressione genica Assay on Demand (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA Assay No. Hs99999139\_m1). Il gene housekeeping gliceraldeide-3-fosfatodeidrogenasi (GAPDH) (Assay No.Hs99999905\_m1) è stato utilizzato per normalizzare le variazioni del cDNA. La reazione è stata condotta nello strumento 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem), ogni campione è stato analizzato in duplicato impiegando 0,5 µl di cDNA diluito, 10 µl di PCR master mix (Applied Biosystem) e 1 µl di Assay on Demand mix. Il ciclo di PCR utilizzato prevede 10 min a 95°C, seguiti da 40 cicli a 95°C per 15 sec e a 60°C per 1 min. I risultati sono stati analizzati con il metodo delle curve *standard*.

## **2.7 SAGGI ELISA.**

I livelli di TIMP-1 e di OPN, nel siero e nei surnatanti delle colture cellulari, sono stati dosati mediante ELISA, secondo il protocollo indicato dal fornitore del kit (R&D system, Minneapolis, USA e IBL, Germany). (Sensibilità del kit 0.110 ng/ml e 3,33 ng/ml, rispettivamente). La densità ottica è stata misurata a 450 nm usando un lettore di piastra ottica. Il programma I-Smart è stato utilizzato per elaborare una curva *standard*.

## **2.8 SAGGI FUNZIONALI.**

Per valutare i livelli trascrizionali di TIMP-1,  $2 \times 10^6$  di PBMC sono stati stimolati con rOPN 1 µg/ml per 6-16-24 ore e in seguito è stato estratto l'RNA. Al fine di valutare la secrezione di TIMP-1 sono stati condotti esperimenti tempo e dose dipendenti.  $0.2 \times 10^6$

di PBMC sono stati mantenuti in terreno di coltura per 12-24-48-72 ore in presenza o meno di rOPN 1 µg/ml, oppure  $0.2 \times 10^6$  di PBMC sono stati trattati o meno con dosi crescenti di rOPN 0.1-0.5-1-2.5-5 µg/ml (R&D system, Minneapolis, USA) per 48 ore.  $0.5 \times 10^6$  monociti, linfociti T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> e linfociti B CD19<sup>+</sup> sono stati trattati o meno per 48 ore con rOPN 1 µg/ml per valutare la secrezione di TIMP-1 in ELISA. I monociti sono stati stimolati anche in presenza di 10 µg/ml di un anticorpo neutralizzante anti-OPN (R&D system, Minneapolis, USA) per 48 ore.

## **2.9 COLORAZIONE INTRACELLULARE DI TIMP-1.**

Per valutare la produzione di TIMP-1 intra-cellulare,  $1 \times 10^6$  di monociti sono stati coltivati in terreno RPMI 10% FCS e 10 mM Hepes, con o senza rOPN 1 µg/ml per 6 ore in presenza di 10 µg/ml di Brefeldina A (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Dopo 6 ore di coltura, utilizzando il kit commerciale FIX&PERM® (Invitrogen, Carlsbad, USA), le cellule sono state marcate con un anticorpo anti-CD14 coniugato con Fluoroisotiocianato (FITC) (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) e dopo essere state fissate sono state quindi permeabilizzate e marcate con un anticorpo anti-TIMP-1 coniugato con Ficoeritrina (PE) (R&D system, Minneapolis, USA). Le cellule sono state analizzate con lo strumento FACSCalibur (BD, Bioscience, California, USA).

## **2.10 SAGGI DI MORTE CELLULARE.**

L'AICD o la FICD sono state valutate su linfociti T ottenuti da PBMC attivati con PHA 1 µg/ml al giorno 0, coltivati in RPMI1640 10% FBS addizionato di IL-2 2U/ml. Per il test di FICD le cellule sono state riattivate al giorno dodicesimo con PHA 0.1 µg/ml. L'AICD è stata allestita al sesto giorno di coltura mentre la FICD al diciottesimo. Per il saggio di AICD i linfociti T sono stati piastrati in presenza di un anticorpo anti-CD3 adeso al pozzetto (10 µg/ml), mentre per il saggio di FICD i linfociti T sono stati piastrati in presenza di un anticorpo solubile anti-Fas (1 µg/ml) (Clone CH11, Upstate). In entrambi i saggi le cellule ( $5 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ ) sono state coltivate in terreno RPMI1640 + 5%FBS + 1U/ml di IL-2 in presenza o assenza di differenti concentrazioni di rhTIMP-1 per 16 ore. L'AICD è stata allestita anche in presenza di rhTIMP-1 alchilato (1 µg/ml) (Hayakawa T. et al., 1994), mentre entrambi i test sono stati eseguiti anche in presenza di un anticorpo neutralizzante rh-TIMP (3 µg/ml) (R&D system, Minneapolis, USA). Le cellule vive sono state contate mediante esclusione con Blue di Tripano di quelle

morte. Ogni saggio è stato condotto in triplicato e i risultati sono espressi come % di sopravvivenza cellulare così calcolata: (totale delle cellule vive in ogni pozzetto del saggio/totale delle cellule vive in ogni rispettivo pozzetto di controllo)X 100.

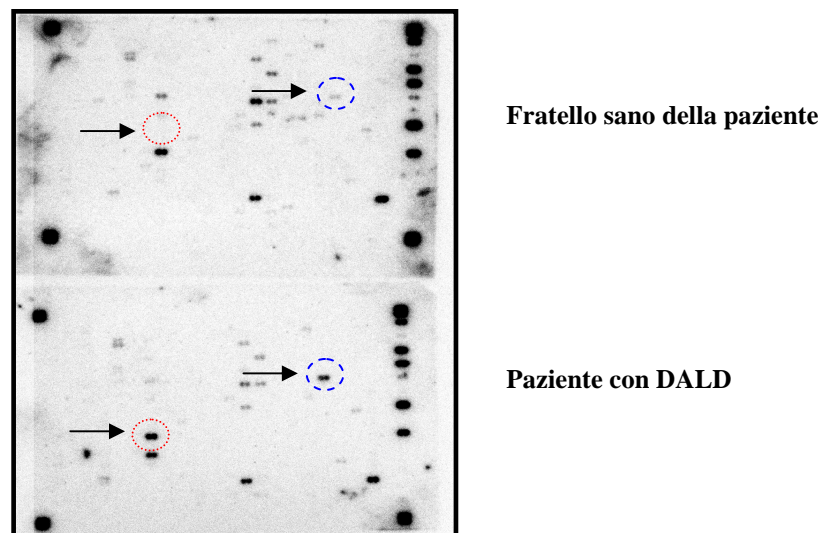
### **2.11 ANALISI STATISTICHE.**

Per quello che riguarda i saggi ELISA, l'approssimazione ad una distribuzione normale della popolazione è stata testata con la statistica della simmetria. I valori sierici di TIMP-1 e di OPN sono espressi come mediana e 25° e 75° percentile. Il test impiegato per paragonare i risultati ottenuti è stato il test non parametrico Mann-Whitney U-test, per dati non appaiati, mentre il test di Wilcoxon è stato utilizzato per l'analisi dei dati appaiati. Sono stati assunti valori di p a due code e il *cut-off* di significatività è  $p < 0.05$ . Le analisi statistiche sono state effettuate impiegando il software GraphPad Instat (San Diego, California, USA).

### 3. RISULTATI

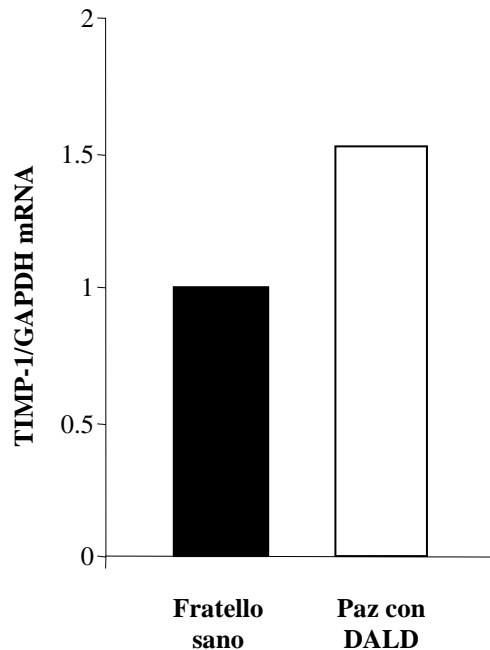
#### 3.1 TIMP-1 e OPN sono iper-espressi in una paziente con DALD.

Utilizzando un *macroarray* a cDNA è stata paragonata l'espressione di 573 geni coinvolti nell'apoptosi o nell'attivazione cellulare, nei linfociti T ottenuti da una paziente con DALD e dal fratello sano. L'mRNA è stato ottenuto da PBMC mantenuti in coltura per 6 giorni in presenza di IL-2 e PHA. L'espressione di diversi geni è risultata diversa nel paziente rispetto al controllo, ma in particolare l'aumentata espressione di OPN (già descritta in un lavoro precedente: Chiocchetti A. et al., 2004), e di TIMP-1 (**Figura 1a**). L'iper-espressione di TIMP-1 in questi campioni è stata confermata con la tecnica della Real-Time PCR, normalizzandone i livelli trascrizionali con quelli del gene della GAPDH. I risultati mostrano che i linfociti T della paziente presentano livelli di TIMP-1 aumentati di 1.6 volte, rispetto a quelli del fratello sano (**Figura 1b**). Questi dati ci hanno suggerito un possibile coinvolgimento di TIMP-1 nella patogenesi dell'ALPS/DALD.



**Figura 1a:** *TIMP-1 e OPN sono iper-espressi nei linfociti T attivati con PHA di una paziente con DALD.* Autoradiografia della membrana ibridizzata con il cDNA di una paziente con DALD e di suo fratello sano. Sono indicati gli spots che corrispondono al cDNA di TIMP-1 (linea tratteggiata) e di OPN (linea a puntini).





*Figura 1b: TIMP-1 è iper-espresso nei linfociti T attivati con PHA di una paziente con DALD. Livelli trascrizionali di TIMP-1 valutati in Real-Time PCR. I valori sono stati normalizzati a quelli del gene della GAPDH. I risultati sono espressi come aumento relativo rispetto ai livelli del fratello sano.*

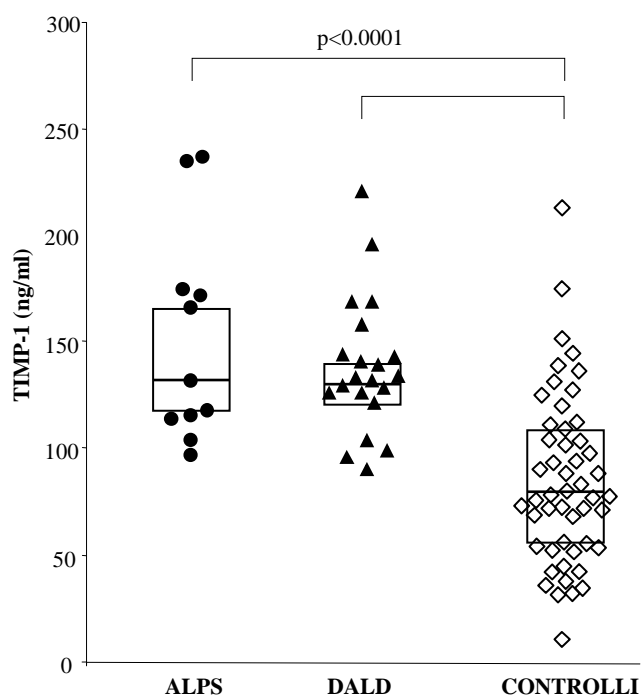
### **3.2 TIMP-1 è iper-espresso nel siero dei pazienti con ALPS e con DALD.**

Al fine di generalizzare il dato ottenuto con il macroarray e la Real-Time PCR e spostare l'attenzione sui livelli proteici di TIMP-1, sono stati valutati i livelli di TIMP-1 nel siero mediante saggio ELISA, in 11 pazienti con ALPS, 21 con DALD e 50 controlli sani.

I risultati mostrano che i livelli di TIMP-1 sono aumentati di 1.5 volte nei pazienti con ALPS e DALD [mediana= 131 ng/ml; 25°-75° percentile 119-164 ng/ml] rispetto ai controlli sani [mediana= 83 ng/ml, 25°-75° percentile 56-110 ng/ml) ( $p < 0.0001$ )]. I livelli di TIMP-1 sono simili nei due gruppi di pazienti [ALPS mediana= 132 ng/ml, 25°-75° percentile 117-171 ng/ml); DALD mediana= 131 ng/ml, 25°-75° percentile 122-141 ng/ml) (per entrambi i gruppi  $p < 0.0001$ )] (**Figura 2**).

Per valutare se gli elevati livelli di TIMP-1 correlassero con varianti nel suo gene, sono stati sequenziati gli esoni e le giunzioni introne-esone del gene di TIMP-1, in tutti i pazienti con ALPS o DALD e nei controlli. Di tutti i polimorfismi descritti nella popolazione caucasica, nel nostro studio sono stati riscontrati i 5 descritti nella **Tabella I**. Tuttavia, i risultati ottenuti relativi alle frequenze genotipiche ed alleliche di questi

polimorfismi non presentano nessuna differenza significativa tra pazienti e controlli e non correlano con gli elevati livelli di TIMP-1 (dati non mostrati). Questo dato suggerisce che gli elevati livelli di TIMP-1 non hanno basi genetiche.



**Figura 2:** I pazienti con ALPS e DALD presentano elevati livelli sierici di TIMP-1. Concentrazione sierica di TIMP-1 (ng/ml) in 11 con ALPS (cerchi neri) e 21 con DALD (triangoli neri) e 50 controlli sani (diamanti bianchi). Le linee in nero rappresentano la mediana e i boxes il 25° e 75° percentile. Il valore della  $p$  è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney U-test.

**Tabella I.**

	<b>SNP</b>	<b>posizione</b>	<b>ref*</b>
1	IVS4+478 G>C	introne 4	rs 5953060
2	+372 T>C	esone 5	rs 4898
3	IVS5+673 A>G	introne 5	rs 6609533
4	+1053 G>T	3'UTR	rs 2070584
5	+1187 G>A	3'UTR	rs 6609534

\* <http://snpper.chip.org> +1 dall' ATG.

### 3.3 OPN ricombinante induce la produzione di TIMP-1 *in vitro*.

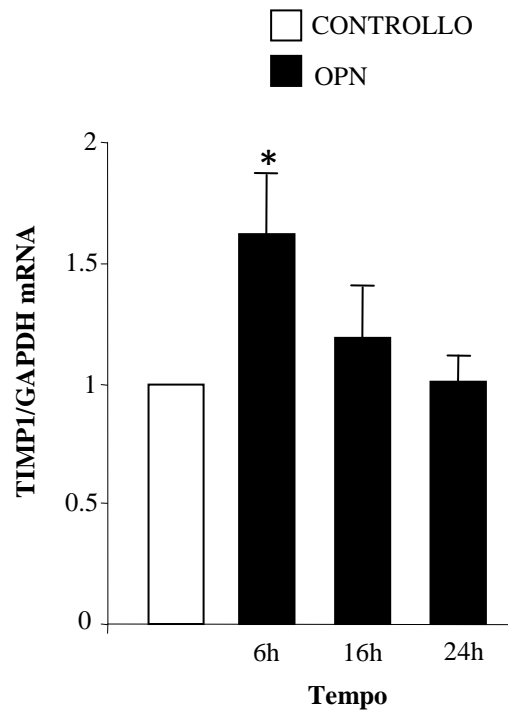
In un lavoro precedente abbiamo dimostrato che anche i livelli sierici di OPN sono significativamente più elevati nei pazienti con ALPS o DALD rispetto ai controlli sani e l'analisi dei nostri pazienti ha confermato questa osservazione, con valori mediani di OPN pari a 230 ng/ml nei pazienti con ALPS, 250 ng/ml in quelli con DALD, e 142 ng/ml nei controlli ( $p < 0.05$  e  $p < 0.001$ , rispettivamente).

Dal momento che sia TIMP-1 sia OPN sono iper-espressi nei pazienti con ALPS/DALD abbiamo valutato se i due fattori fossero funzionalmente associati verificando se rOPN potesse influenzare direttamente l'espressione di TIMP-1, *in vitro*.

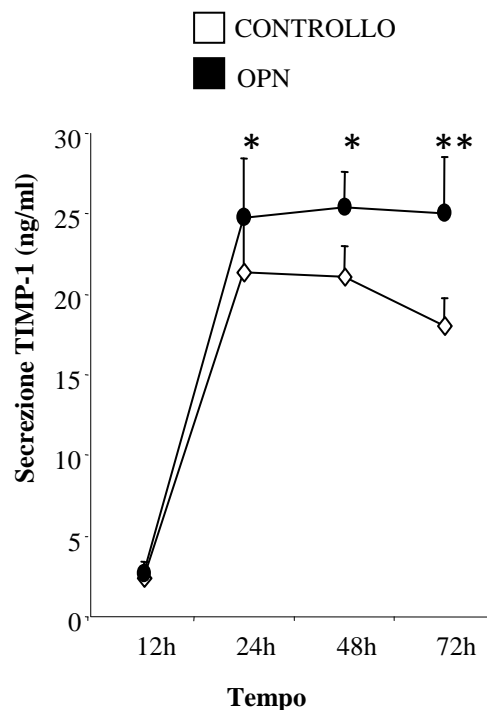
PBMC di donatori sani sono stati coltivati in presenza o in assenza di rOPN e l'espressione di TIMP-1 è stata valutata a differenti tempi di trattamento sia a livello dell'mRNA, in Real-Time PCR, sia a livello proteico, in ELISA.

I dati ottenuti in Real-Time PCR mostrano che rOPN induce in maniera significativa ( $p < 0.05$ ) i livelli dell'mRNA di TIMP-1 già dopo 6 ore di trattamento rispetto alle cellule non trattate, e che questi livelli decrescono nelle successive 16 e 24 ore (**Figura 3a**). Quindi è stata valutata la secrezione di TIMP-1 mediante ELISA in PBMC stimolati o meno con rOPN 1  $\mu\text{g/ml}$  per 12-24-48-72 ore. I risultati mostrano che i PBMC presentano una secrezione spontanea di TIMP-1 dopo 24 ore di coltura ( $p < 0.05$ ), che si riduce a 72 ore; il trattamento con rOPN aumenta questa secrezione di TIMP-1 del 50% durante le prime 24 ore ( $p < 0.01$ ) e i livelli non diminuiscono nelle successive 72 ore (**Figura 3b**). L'effetto di OPN sulla secrezione di TIMP-1 non è dovuto alla sua capacità di inibire l'apoptosi in quanto la conta delle cellule morte, valutata con Blu di Tripiano e la valutazione del rilascio di LDH nel surnatante, non variano nelle diverse condizioni sperimentali (dati non mostrati). Inoltre, ad ogni tempo preso in esame è stata valutata la percentuale delle differenti popolazioni cellulari ( $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD8}^+$ ,  $\text{CD14}^+$  e  $\text{CD19}^+$ ) presenti nella coltura mediante citofluorimetria. Quest'analisi non ha evidenziato nessuna variazione significativa di queste popolazioni cellulari, il che esclude che l'effetto osservato fosse dovuto ad una selezione di una particolare sottopopolazione cellulare indotta da OPN (dati non mostrati).

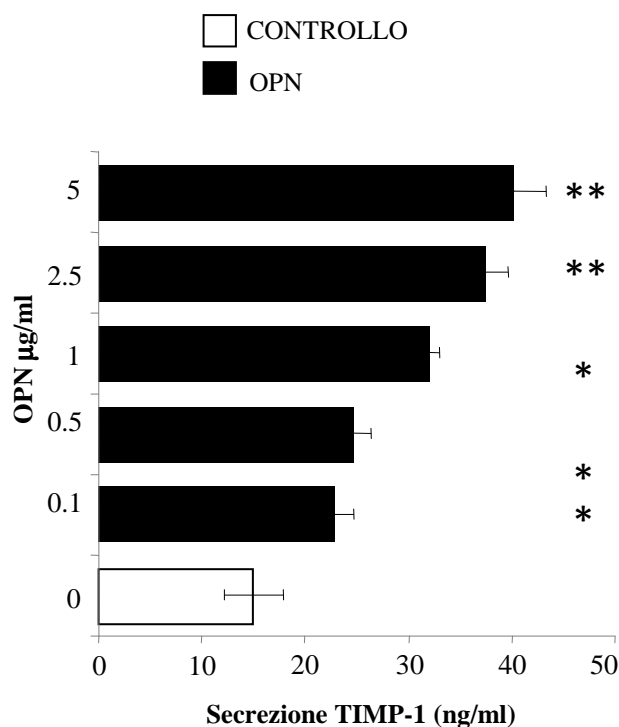
Per valutare l'effetto dose-risposta di OPN, la secrezione di TIMP-1 è stata valutata su PBMC coltivati per 48 ore in presenza o meno di concentrazioni crescenti di rOPN (0,1-0,5-1-2,5-5  $\mu\text{g/ml}$ ). I risultati mostrano un effetto dose dipendente ( $p < 0.05$ ) di rOPN, che alla dose di 5  $\mu\text{g/ml}$  aumenta la secrezione di TIMP-1 di circa 2 volte ( $p < 0.01$ ) (**Figura 3c**).



**Figura 3a: rOPN induce l'espressione di TIMP-1 in vitro.** Livelli trascrizionali di TIMP-1 dopo stimolazione con rOPN 1 $\mu$ g/ml in colture di PBMC. I livelli dell'mRNA di TIMP-1 sono stati valutati in Real-Time PCR dopo 6-16-24 ore di trattamento e normalizzati rispetto al gene della GAPDH. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Wilcoxon \*  $p < 0.05$ .



**Figura 3b: rOPN induce i livelli proteici di TIMP-1 in maniera tempo-dipendente.** Produzione di TIMP-1 da PBMC dopo stimolazione con rOPN 1 $\mu$ g/ml. I livelli di TIMP-1 sono stati valutati in ELISA dopo 12-24-48-72 ore di stimolazione. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Wilcoxon



**Figura 3c: rOPN induce i livelli proteici di TIMP-1 in maniera dose-dipendente.** Produzione di TIMP-1 da PBMC dopo stimolazione con differenti dosi di rOPN (0,1-0,5-1-2,5-5 µg/ml). I livelli di TIMP-1 sono stati valutati in ELISA dopo 48 ore di stimolazione. Il valore della  $p$  è stato calcolato utilizzando il test statistico di Wilcoxon \*  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

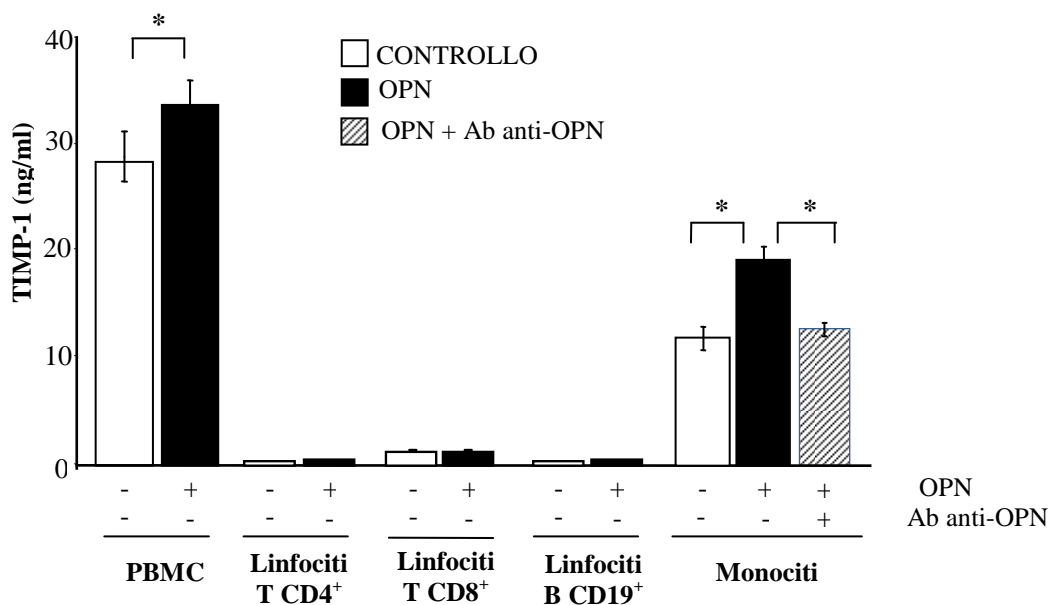
### 3.4 I monociti sono i principali produttori di TIMP-1.

Al fine di identificare quale tipo cellulare fosse responsabile della produzione di TIMP-1 indotta da rOPN, è stato testato l'effetto di rOPN su popolazioni purificate di monociti CD14<sup>+</sup>, linfociti T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> e linfociti B CD19<sup>+</sup>.

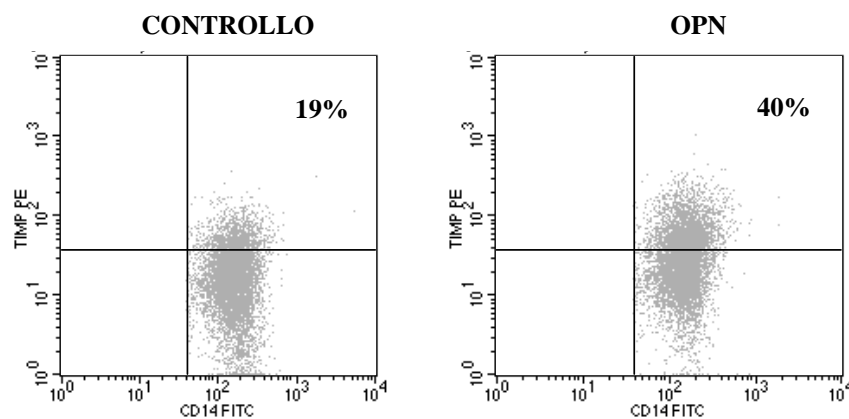
I diversi tipi cellulari sono stati trattati o meno con 1 µg/ml di OPN per 48 ore e i surnatanti delle colture sono stati quindi raccolti per valutare la secrezione di TIMP-1 mediante ELISA. I risultati dimostrano che rOPN induce in maniera significativa la secrezione di TIMP-1 nei monociti ( $p = 0.01$ ), mentre non ha nessun effetto sulle altre popolazioni cellulari prese in esame (**Figura 4a**). La specificità dell'azione di rOPN è stata testata allestendo degli esperimenti con monociti trattati con rOPN anche in presenza di 10 µg/ml di un anticorpo neutralizzante OPN. I risultati dimostrano che in presenza dell'anticorpo anti-OPN la produzione di TIMP-1 indotta da OPN è abrogata ( $p < 0.05$ ), dimostrandone la sua specificità (**Figura 4a**).

Per confermare l'effetto di rOPN sulla produzione di TIMP-1 nei monociti, è stata valutata l'espressione di TIMP-1 intra-cellulare, mediante immunofluorescenza intra-

citoplasmatica. I monociti sono stati stimolati con 1  $\mu\text{g/ml}$  di OPN o meno per 6 ore in presenza di 10  $\mu\text{g/ml}$  di Brefeldina A. Dopo 6 ore di coltura le cellule sono state permeabilizzate e marcate con un anticorpo anti-CD14 e con un anticorpo anti-TIMP-1. L'analisi citofluorimetrica conferma una produzione basale di TIMP-1 che risulta sostanzialmente aumentata dal trattamento con rOPN (**Figura 4b**). Questo effetto non è dovuto ad una modulazione della morte cellulare in seguito al trattamento con rOPN, visto che livelli simili di morte cellulare sono stati rilevati nei campioni trattati o meno con rOPN, valutando il rilascio di LDH e la conta delle cellule morte con Blu di Tripano.



**Figura 4a:** I monociti sono il principale tipo cellulare che produce TIMP-1 in risposta a rOPN. Produzione di TIMP-1 da parte di differenti popolazioni cellulari dopo stimolazione con o senza rOPN 1  $\mu\text{g/ml}$  o con un anticorpo anti-OPN 10  $\mu\text{g/ml}$ , valutati in ELISA dopo 48 ore. Il valore della  $p$  è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney U-test \* $p < 0.05$ .

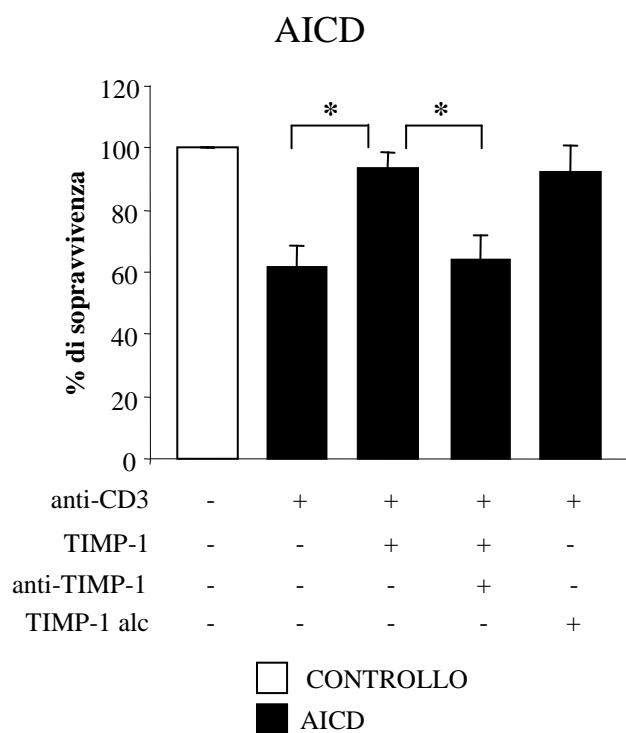


**Figura 4b:** I monociti producono TIMP-1 in risposta a rOPN. Produzione di TIMP-1 intra-cellulare da monociti dopo stimolazione con o senza rOPN 1  $\mu\text{g/ml}$ . I livelli di TIMP-1 sono stati valutati in citofluorimetria dopo 6 ore di stimolazione.

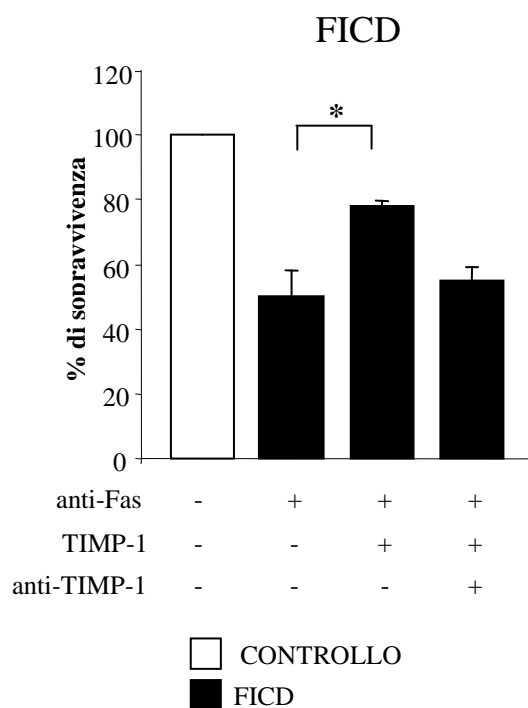
### 3.5 TIMP-1 inibisce l'apoptosi linfocitaria.

Dal momento che ALPS e DALD sono malattie autoimmuni dovute ad un difetto di morte cellulare che causa un accumulo di linfociti, e in passato abbiamo dimostrato che OPN concorre allo sviluppo della malattia inibendo l'AICD, abbiamo valutato se anche TIMP-1 potesse contribuire al deficit di apoptosi, testando l'effetto di rTIMP-1 nell'AICD e nella FICD dei linfociti T.

I linfociti T sono stati ottenuti coltivando i PBMC di donatori sani, con IL-2 e PHA per 6 o 18 giorni. L'AICD è stata valutata al sesto giorno stimolando le cellule con 10 µg/ml di un anticorpo anti-CD3 in presenza o meno di rTIMP-1 1 µg/ml, per 16 ore. Al diciottesimo giorno invece è stata valutata la FICD, trattando le cellule con 1 µg/ml di un anticorpo anti-Fas, in presenza o meno di rTIMP-1 1 µg/ml, per 16 ore. Dopo 16 ore le cellule sono state contate con il colorante Blu di Tripano. I risultati dimostrano che le cellule coltivate in presenza di rTIMP-1 presentano livelli di AICD e FICD significativamente più bassi rispetto a quelle non trattate con rTIMP-1 ( $p < 0.05$  e  $p < 0.01$ , rispettivamente) (**Figura 5a e 5b**). Esperimenti di titolazione di rTIMP-1 hanno mostrato che l'effetto è dose-dipendente nel *range* di 0.25-1 µg/ml (dati non mostrati). Per valutare la specificità dell'effetto di TIMP-1, gli esperimenti di AICD e di FICD sono stati allestiti anche in presenza di un anticorpo neutralizzante rTIMP-1 (3µg/ml). I risultati ottenuti dimostrano che l'anticorpo anti-TIMP-1 annulla l'effetto di protezione dalla morte cellulare dovuto a rTIMP-1, dimostrando la sua specificità. Inoltre, per valutare se l'effetto anti-apoptotico di TIMP-1 fosse dipendente dalla sua capacità di inibire le MMP, l'AICD è stata allestita anche in presenza di 1 µg/ml di TIMP-1 alchilato, il quale perde questa funzione. In questo caso l'effetto anti-apoptotico è stato comunque riscontrato a supporto del fatto che l'azione anti-apoptotica di TIMP-1 avviene con un meccanismo MMP-indipendente (**Figura 5a**).



**Figura 5a: rTIMP-1 inibisce l'AICD dei linfociti T.** % di sopravvivenza dei linfociti T mantenuti in coltura per 6 giorni. L'AICD è stata indotta con un anticorpo anti-CD3 10 µg/ml in presenza o in assenza di rTIMP-1 1 µg/ml per 16 ore. Il test è stato condotto anche in presenza di un anticorpo neutralizzante TIMP-1 3 µg/ml e in presenza di 1 µg/ml della forma alchilata di rTIMP-1. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney U-test \* p<0.05; \*\*p<0.01.



**Figura 5b: rTIMP-1 inibisce la FICD dei linfociti T.** % di sopravvivenza dei linfociti T mantenuti in coltura per 18 giorni. La FICD è stata indotta con un anticorpo anti-Fas solubile 1 µg/ml, in presenza o in assenza di rTIMP-1 1 µg/ml per 16 ore. Il test è stato condotto anche in presenza di un anticorpo neutralizzante TIMP-1 3 µg/ml. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney U-test \* p<0.05; \*\*p<0.01.



#### 4. DISCUSSIONE

Questo lavoro dimostra che i livelli di TIMP-1 sono aumentati nei pazienti con ALPS o DALD e che questo può peggiorare il difetto apoptotico dei linfociti T, contribuendo allo sviluppo della malattia. Questo è supportato dai dati *in vitro* che dimostrano che TIMP-1 è in grado di inibire l'AICD e la FICD di linfociti T attivati, come altri autori hanno dimostrato inibire l'apoptosi di linfociti B sia dipendente sia indipendente da Fas (Guedez L. et al.,1998). La concentrazione a cui TIMP-1 sviluppa questo effetto nei nostri esperimenti *in vitro* è superiore a quella rilevata nel siero dei pazienti, ma questo non esclude un'effettiva azione di TIMP-1 nella malattia in quanto è possibile che la concentrazione di TIMP-1 a livello dei tessuti linfoidi secondari sia superiore a quella dosata nel siero. L'effetto di TIMP-1 nell'inibire l'apoptosi è indipendente dalla sua capacità di inibire le MMP in quanto l'alchilazione di TIMP-1, che abroga l'attività anti-MMP, non abroga invece l'attività anti-apoptotica.

L'effetto anti-apoptotico di TIMP-1 potrebbe quindi essere mediato dalla stimolazione di CD63, noto recettore di TIMP-1, membro della famiglia delle tetraspannine, spesso utilizzato come *marker* degli endosomi tardivi, ma espresso anche in membrana da diversi tipi cellulari, tra cui i linfociti T attivati. In linea con questa possibilità, è noto che CD63 funziona come molecola costimolatoria sui linfociti T e trasmette segnali anti-apoptotici in diversi tipi cellulari (Pfistershammer K. et al.,2006; Jung KK. et al.,2006).

Questi dati suggeriscono che gli elevati livelli di TIMP-1 potrebbero contribuire al difetto di apoptosi linfocitaria tipico di ALPS e DALD in collaborazione con altri fattori identificati nel nostro laboratorio quali, OPN e perforina (Chiocchetti A. et al.,2004; Clementi R. et al.,2006).

I pazienti con ALPS e con DALD presentano elevati livelli di OPN i quali potrebbero favorire lo sviluppo della malattia inibendo l'AICD. L'effetto anti-apoptotico di OPN potrebbe essere indipendente da quello di TIMP-1 dal momento che, a differenza di TIMP-1, non protegge dalla FICD e inoltre rOPN non induce la secrezione di TIMP-1 in colture di linfociti T.

Perforina è una proteina contenuta nei granuli citolitici delle cellule citotossiche ed è coinvolta nel mediare l'apoptosi di differenti cellule bersaglio. Mutazioni bialleliche a carico del gene di perforina compromettono la citotossicità cellulo-mediata e la *clearence* virale, causando la linfocitocitosi emofagocitica familiare, una grave

immunodeficienza con aspetti di linfoproliferazione (Stepp SE. et al.,1999; Feldmann J. et al.,2002; Fadeel B. et al.,2001).

In un lavoro precedente abbiamo identificato mutazioni a carico di perforina che riducono l'attività di questa proteina e favoriscono lo sviluppo di ALPS e DALD. Questo effetto potrebbe essere dovuto al fatto che la citotossicità cellulo-mediata è coinvolta nello spegnimento della risposta immunitaria eliminando i linfociti attivati. In uno studio recente è stato in effetti dimostrato che l'AICD mediata da perforina potrebbe in parte compensare il difetto apoptotico tipico dei pazienti con ALPS (Mateo V. et al., 2007). E' noto che il recettore di TIMP-1, CD63, è espresso a livello dei granuli citolitici delle cellule citotossiche e la sua espressione risulta aumentata nelle cellule citotossiche attivate (Oelman E. et al.,2003). Queste osservazioni suggeriscono che gli elevati livelli di TIMP-1 potrebbero anche influenzare l'attività di perforina.

In letteratura è stato dimostrato che la variante +372C nel gene di TIMP-1 è associata alla sclerodermia sistemica nella popolazione italiana maschile, ma non in quella femminile (Indelicato M. et al.,2006). Nel nostro studio è stata rilevata la stessa distribuzione allelica tra pazienti e controlli e nessuna differenza nei due sessi. Quindi, al contrario di OPN, i cui elevati livelli sono in parte da ricondurre a varianti alleliche del suo gene, non abbiamo riscontrato nessuna variazione associata agli elevati livelli di TIMP-1.

La produzione elevata di TIMP-1 nei pazienti con ALPS potrebbe essere secondaria ad altri stimoli. IL-6, IL-1 $\beta$ , b-FGF e PDGF (Lambert E. et al.,2004) inducono la secrezione di TIMP-1, ma il loro coinvolgimento nei nostri pazienti è improbabile poiché solo pochi di loro presentano un aumento dei livelli di queste citochine (dati non mostrati). Al contrario, uno stimolo efficace potrebbe essere OPN, in quanto i suoi livelli sono significativamente aumentati nei pazienti. In linea con questa possibilità, i nostri esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che OPN induce una sostanziale secrezione di TIMP-1 da parte dei monociti a concentrazioni paragonabili a quelle rilevabili *in vivo*.

In aggiunta al suo effetto sull'apoptosi dei linfociti, TIMP-1 potrebbe in teoria esercitare altri effetti nello sviluppo dell'ALPS. Per esempio, i pazienti con ALPS spesso mostrano iper-gammaglobulinemia e altri autori hanno riportato un aumento dei livelli di IL-10 (Lopatin U. et al.,2001). Entrambe queste caratteristiche possono essere influenzate da TIMP-1, poiché è stato dimostrato che questo regola la differenziazione delle cellule B e induce l'espressione di IL-10 (Guedez L. et al.,2001). Inoltre, i livelli

sierici di TIMP-1 sono stati correlati con iper-gammaglobulinemia in pazienti con fascite eosinofila (Jinnin M. et al.,2004). Tuttavia, non è stata rilevata alcuna correlazione significativa tra TIMP-1 e i livelli di IL-10 e l'iper-gammaglobulinemia nei nostri pazienti (dati non mostrati).

In conclusione, questi dati suggeriscono che le varianti geniche di OPN, che sono associate all'ALPS e a elevati livelli sierici di OPN, contribuiscono al difetto di apoptosi linfocitaria alla base dell'ALPS in due modi: inibendo l'AICD direttamente e inducendo elevati livelli di TIMP-1, che causano un'inibizione sia dell'AICD sia della FICD. Questo studio apre nuove possibilità terapeutiche per il trattamento dei pazienti con ALPS/DALD volti a inibire l'effetto di questi fattori che concorrono allo sviluppo della malattia.

## ***CONCLUSIONI GENERALI DELLA TESI***

Questa tesi dimostra che OPN, citochina coinvolta nella risposta infiammatoria e nella risposta immunitaria di tipo TH1, può agire come fattore in grado di favorire lo sviluppo sia di malattie iper-infiammatorie come la SIRS/sepsi, sia di malattie autoimmuni, come l'ALPS. L'effetto sulla sepsi (**articolo 1**) può essere in parte mediato dal potenziamento della secrezione di IL-6, considerata una citochina chiave dell'infiammazione acuta e della sepsi. Questa osservazione può avere una valenza sia diagnostica sia terapeutica. Dal punto di vista diagnostico la valutazione dei livelli sierici di OPN può essere uno strumento aggiuntivo che si affianca alla valutazione dei livelli di PCT e IL-6 nel *follow-up* della malattia. Dal punto di vista terapeutico, lo sviluppo di antagonisti di OPN potrebbe aiutare nel controllo della malattia.

L'effetto sull'ALPS (e altre malattie autoimmuni) era stato indicato da lavori precedenti che dimostravano la presenza di elevati livelli sierici di OPN nei pazienti, in parte legata a particolari varianti del gene di OPN che ne stabilizzano l'mRNA; queste varianti favoriscono in modo marcato lo sviluppo dell'ALPS influenzando negativamente l'efficienza dei meccanismi di spegnimento della risposta immunitaria, già resi gravemente inefficienti dai difetti genetici a carico del sistema di Fas. Quest'azione può estrinsecarsi in due modi: 1) attraverso un'inibizione diretta mediata da OPN dell'AICD dei linfociti T (dimostrata in un precedente lavoro); 2) attraverso l'induzione della secrezione di TIMP-1 da parte dei monociti con conseguente effetto anti-apoptotico attivo sia sull'AICD che sulla FICD e mediato dall'interazione di TIMP-1 con il suo recettore CD63 (**articolo 2**). Anche in questo caso quest'osservazione può avere una valenza terapeutica, in quanto lo sviluppo di antagonisti di OPN o di TIMP-1 potrebbe fornire nuovi strumenti per il controllo dell'ALPS, che oggi si affida esclusivamente a pesanti regimi di terapia immunosoppressiva.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.*, 1992;20: 864-874.
2. Levy MM., Fink MP., Marshall JC., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal SM., Vincent JL., and Ramsay G. International Sepsis Definitions. *Conference Intensive Care Med.*, 2003;29:530-8.
3. Guidet B., Aegerter P., Gauzit R., Meshaka P., and Dreyfuss D. Incidence and impact of organ dysfunctions associated with sepsis. *Chest.*, 2005;127:942-51.
4. Barati M, Bashar FR, Shahrami R, Zadeh MH, Taher MT, Nojomi M. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 and the diagnosis of sepsis. *J.Crit. Care*, 2009 Nov 13.
5. Marshall JC., Christou NV., Horn R. and Meakins JL. The microbiology of multiple organ failure: The proximal gastrointestinal tract as an occult reservoir of pathogens. *Arch. Surg.*, 1988;123:309–315.
6. Lavoie PM., Thibodeau J., Erard F. and Sekaly RP. Understanding the mechanism of action of bacterial superantigens from a decade of research. *Immunol. Rev.*, 1999;168:257-269.
7. López-Bojórquez LN, Dehesa AZ, Reyes-Terán G. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock. *Arch. Med. Res.*, 2004;35:465-79.
8. Bernard GR., Vincent JL., Laterre PF., LaRosa SP., Dhainaut JF., Lopez-Rodriguez A., Steingrub JS., Garber GE., Helterbrand JD., Ely EW. and Fisher CJ Jr. Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *New Engl. J. Med.*, 2001;10:699-709.
9. Matthay MA. Severe sepsis--a new treatment with both anticoagulant and antiinflammatory properties. *New Engl. J. Med.*, 2001;344:759-62.
10. Hotchkiss RS., Swanson PE., Freeman BD., Tinsley KW., Cobb JP., Matuschak GM., Buchman TG. and Karl IE. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit. Care Med.*, 1999;27:1230-51.
11. van den Berghe G., Wouters P., Weekers F., Verwaest C., Bruyninckx F., Schetz M., Vlasselaers D., Ferdinande P., Lauwers P. and Bouillon R. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *New Engl. J. Med.*, 2001;1345:1359-67.
12. Eigler A., Sinha B., Hartmann G. and Endres S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol. Today*, 1997;18:487-492.

13. Abraham E, Glauser MP, Butler T, Garbino J, Gelmont D, Laterre PF, Kudsk K, Bruining HA, Otto C, Tobin E, Zwingelstein C, Lesslauer W, Leighton A. p55 Tumor necrosis factor receptor fusion protein in the treatment of patients with severe sepsis and septic shock. A randomized controlled multicenter trial. Ro 45-2081 Study Group. *JAMA*, 1997;277:1531-8.
14. van Deventer SJ. Cytokine and cytokine receptor polymorphisms in infectious disease. *Intensive Care Med.*, 2000;1:S98-102.
15. Lederer JA., Rodrick ML. and Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock*, 1999;11:153-9.
16. Hotchkiss RS., Tinsley KW., Swanson PE., Chang KC., Cobb JP., Buchman TG., Korsmeyer SJ. and Karl IE. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *PNAS.*, 1999;96:14541-6.
17. Riedemann NC., Guo RF. and Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat. Med.*, 2003;9:517-24.
18. Nat R., Radu E., Regalia T. and Popescu L M. Apoptosis in the immune system: Fas-induced apoptosis in monocytes-derived human dendritic cells. *J. Cell. Mol. Med.*, 2002; 6:223-234.
19. Peng Y., Martin D., Kenkel J., Zhang K., Ogden C. and Elkon K. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. *J. Autoimm.*, 2007;29:303-309.
20. Ashkenazi A. and Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998;281:1305-1308.
21. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 1997;88:355-36.
22. Los MC., Stroh RU. Janiche, I. H. Engels, K. Schulze-Osthoff Caspases: more than just killers? *Trends in Immunology*, 2001 22:31-4.
23. Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998;281:1309-1312.
24. Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssiere J.C. and Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.*, 1995; 9:277-1287.
25. Kumar S. Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death and Differentiation Nature*, 1999;6:1060-1066.
26. Rieux-Laucat F., Le Deist F. and Fisher A. Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death and Differentiation Nature*, 2003; 10:124-133.
27. Siegel RM., Frederiksen JK., Zacharias DA., Chan FK., Johnson M., Lynch D., Tsien RY. and Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*, 2000;288:2354-2357.
28. Krammer P., Arnold R. and Lavrik I. Life and death in peripheral T cells. *Nature Immun.*, 2007;7:532-542.

29. Brenner D., Golks A., Kiefer F., Kramme P. and Arnold R. Activation or suppression of NFκB by HPK1 determines sensitivity to activation-induced cell death. *The EMBO Jour.*, 2005;24:4279-4290.
30. Brenner D., Golks A., Becker M., Muller W., Frey C., Novak R., Melamed D., Kiefer F. and Arnold R. Caspase cleaved HPK1 induces CD95L-independent activation-induced cell death in T and B lymphocytes. *Blood*,2007;110:3968-77.
31. Zhang J., Xu X. and Liu Y. Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity. *Cell. and Molec. Immun.*, 2004;1:186-192.
32. Tsonis IA., Avrameas S. and Moutsopoulos HM. Autoimmunity and pathophysiology. *J. Autoimmun.*, 2007;29:203-5.
33. Kuijff ML., Godschalk PC., Gilbert M., Endtz HP., Tio-Gillen AP., Ang CW., van Doorn PA. and Jacobs BC. Origin of ganglioside complex antibodies in Guillan-Barrè syndrome. *J. Neuroimmunol.*, 2007;2:69-73.
34. Canale VC. And Smith CH. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J. Pediatr.*, 1967;70:891-899.
35. Straus SE., Sneller M., Lenardo M J., Puck JM. and Strober W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Annals of Internal Medicine*, 1999;130:591-601.
36. Bleesing JJH., Brown MR., Straus SE., Dale JK, Siegel RM., Jonhson M., Lenardo MJ., Puck JM. and Fleisher TA., Immunophenotypic profiles in family with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*, 2001,98:2466-2473.
37. Lopatin U., Williams RK., Bleesing JJH., Dale JK., Wong D., Feldstein JT., Fritz S., Morrow MR., Fuss I, Sneller MC., Raffeld M., Fleisher TA., Puck JM., Strober W., Jaffe ES. and Straus SSE. Increases in circulating and lymphoid tissue interleukin-10 in autoimmune lymphoproliferative syndrome are associated with disease expression. *Blood*, 2001,97:3161-3170.
38. Rennò T., Hahne M. and MacDonald H. Proliferation is a prerequisite for bacterial super-antigen-induced T cells apoptosis in vivo. *J. Exp. Med.*, 1995,181:2283-2287.
39. Campagnoli MF., Garbarini L., Quarello P., Garelli E., Carando A., Baravalle V., Doria A., Biava A., Chiocchetti A., Rosolen A., Dufur C., Dianzani U. and Ramenghi U. The broad spectrum of autoimmune lymphoproliferative disease: molecular bases, clinical features and long-term follow-up in 31 patients. *Haematologica*, 2006;91:538-541.
40. Martin DA., Zheng L., Siegel RM., Huang B., Fisher GH, Wang J., Jackson CE., Puck JM., Dale J., Straus SE., Peter ME., Krammer PH., Fesik S. and Lenardo MJ. Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia. *PNAS*, 1999,96: 4552-4557.

41. Oliveira JB., Bidere N., Niemela JE., Zheng L., Sakai K., Nix CP., Danner RL., Barb J., Munson PJ., Puck JM., Dale J., Straus SE., Fleisher TA. and Lenardo MJ. NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *PNAS*, 2007; 21:8953-8958.
42. Dianzani U., Bragardo M., DiFranco D., Alliaudi C., Scagni P., Buonfiglio D., Redoglia V., Bonisconi S., Correria A., Dianzani I. and Ramenghi U. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood*, 1997;89:2871-9.
43. Jackson CE., Fischer RE., Hsu AP., Anderson SM., Choi Y., Wang J., Dale JK, Fleisher TA., Middleton LA., Sneller MC., Lenardo MJ., Straus SE. and Puck JM. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance. *Am. J. Hum. Gen.*, 1999,64:1002-1014.
44. Ramenghi U., Bonisconi S., Migliaretti G., DeFranco S., Bottarel F., Gambaruto C., DiFranco D., Priori R., Conti F., Dianzani I., Valesini G., Merletti F. and Dianzani U. Deficient of apoptosis pathway without fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. *Blood*, 2000;95,3176-13182.
45. Chiochetti 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. and Dianzani U. High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/ lymphoproliferation. *Blood*, 2004;103-1376-1382.
46. Clementi R., Chiochetti A., Cappellano G., Cerutti E., Ferretti M., Orilieri E., Dianzani I., Ferrarini M., Bregni M., Danesino C., Bozzi V., Putti MC., Cerutti F., Cometa A., Locatelli F., Maccario R., Ramenghi U. and Dianzani U. Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function. *Blood*, 2006;108:3079-84.
47. Benihoud K., Bonardelle D., Bobe P. and Kiger N. MRL/lpr CD4- CD8- and CD8+ T cells, respectively, mediate Fas-dependent and perforin cytotoxic pathways. *Eur. J. Immunol.*, 1997; 27:415-420.
48. Rieux-Laucat F., Le Deist F., Hivroz C., Roberts IA., Debatin KM., Fischer A. and de Villartay JP. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*, 1995;268:1347-9.
49. Watanabe-Fukunaga R., Brannan C., Copeland N., Jenkins N. and Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, 1992, 356:314-317.



50. Denhardt DT. , Noda M., O'Regan AW., Pavlin D. and Berman J. S. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodelling and cell survival. *The Journal of Clinical Investig.*, 2001; 9:1055-1061.
51. Gravallesse EM. Osteopontine: a bridge between bone and the immune system. *The Journal of Clinical Investig.*, 2003;112:147-149.
52. Mazzali M., Kipari T., Ophascharoensuk V., Wesson J.A., Johnson R. and Hughes J. Osteopontin: a molecule for all seasons. *Q. J. Med.*, 2002;95:3-13.
53. Naldini A, Leali D., Pucci A., Morena E., Carraro F., Nico B., Ribatti D. and Presta M. Cutting edge: IL1 $\beta$  mediates the proangiogenic activity of osteopontin-activated human monocytes. *The Journal of Immunology*, 2006:177,4267-4270.
54. O'Regan AW., Nau GJ., Chupp GL. and Berman JS. Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. *Immunol. Today*, 2000;10:475-478.
55. Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone-remodelling. *Exp. Oncol.*, 2004;26:179-84.
56. Prince CW., Oosawa T., Butler WT., Tomana M., Bhowan AS., Bhowan M. Schrohenloher RE. Isolation, characterization and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J. Biol. Chem.*, 1987;272:2900-2907.
57. Senger D. R. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelia growth factor through cooperative mechanism involving the  $\alpha_v\beta_3$  integrin, osteopontin, and thrombin. *Am. J. Pathol.*, 1996;149:293-305.
58. Mitsiades N., Wei-hsuan Yu, Poulaki V., Tsokos M. and I. Stamenkovic Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drugs cytotoxicity. *Cancer Reserch*, 2001;61:577-581.
59. O'Regan A. and Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int. J. Exp. Pathol.*, 2000;81:373-390.
60. Denhardt DT., Noda M., O'Regan AW., Pavlin D. and Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *The Journal of Clinical Investig.*, 2001;107:1055-1061.
61. Ashkar S., Weber GF., Panoutsakopoulou V., Sanchirico ME., Jansson M., Zawaideh S., Rittling S., Denhardt, DT., Glimcher MJ. and Cantor H. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science*, 2000; 287: 860-864.
62. Young MF., Kerr JM., Termine JD., Wewer UM., Wang MG. and McBride OW. and Fisher LW. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics*, 1990;4:491-502.

63. Giacopelli F., Marciano R., Pistorio A., Catarsi P., Caninoi S., Karsenty G. and Ravazzolo R. Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity. *Physiol. Genomics*, 2004;20: 87-96.
64. Shinohara ML., Kim HJ., Kim JH., Garcia VA, and Cantor H. Alternative translation of osteopontin generates intracellular and secreted isoforms that mediate distinct biological activities in dendritic cells. *PNAS.*, 2008;105:7235-9.
65. Shinohara ML., Kim JH, Garcia VA, Cantor H. Engagement of the type I interferon receptor on dendritic cells inhibits T helper 17 cell development: role of intracellular osteopontin. *Immunity*, 2008;29:68-78.
66. Denhardt DT., Giachelli CM. and Rittling SR. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2001;41:723-749.
67. O'Regan AW., Chupp GL., Lowry JA., Goetschkes M., Mulligan N. and Berman JS. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J. Immunology*, 1999;162:1024-1031.
68. Rollo EE. and Denhardt DT. Differential effects of osteopontin on the cytotoxic activity of macrophages from young and old mice. *Immunology*, 1996;4:642-647.
69. Lin YH. and HF. Yang-Yen. The osteopontin-CD44 survival involves activation of the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signalling pathway. *The Journ. of Biological Chem.*, 2001;276:46024-46030.
70. O'Regan AW., Hayden JM. and Berman JS. Osteopontin augments CD3-mediated interferon- $\gamma$  and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. *Journ. of Leukocyte Biology*, 2000; 68:495-502.
71. Hashimoto MD., Sun SR., Rittling DT., Denhardt DT. and Young W. Osteopontin-deficient mice exhibit less inflammation, greater tissue damage and impaired locomotor recovery from spinal cord injury compared with wild-type controls. *The Journal of Neuroscience*, 2007;27:3603-3611.
72. O' Regan A. and Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int. J. Exp. Pathol.*, 2000; 81:373-390.
73. Hur EM., Youssef S., Haws ME., Zhang SY., Sobel R.A and Steinman L. Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nature Immunology*, 2007;8:74-83.
74. Stromnes IM. and Goverman JM. Osteopontin-induced survival of T cells. *Nature Immunology*, 2007;8:19-20.
75. Guo HQ., Cai R., Schroder A. and Kuo PC. Osteopontin is a negative feedback regulator of nitric oxide synthesis in murine macrophages. *The Journal of Immunology*, 2001;166:1079-1086.

76. Takahashi F., Takahashi K., Maeda K., Tominaga S. and Fukuchi Y. Osteopontin is induced by nitric oxide in RAW 264.7 cells. *IUBMB Life*, 2001;49:100-103.
77. Xanthou G., Alissafi T., Semitekolou M., Simoes DCM., Economidou E., Gaga M., Lambrecht BN., Llyod CM. and Panoutsakopoulou V. Osteopontin has a crucial role in allergic airway disease through regulation of dendritic cell subset. *Nature Medicine*, 2007;13:570-588.
78. Rangaswami HA., Bulbule and Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *TRENDS in Cell Biology*, 2006 16:79-87.
79. Rittling SR. and Chambers AF. Role of osteopontin in tumor progression. *Br. J. Cancer*, 2004; 90:1877-1881.
80. Wai PY. and Kuo PC. Osteopontin silencing by small interfering RNA suppresses in vitro and in vivo CT26 murin colon adenocarcinoma metastasis. *Carcinogenesis*, 2004;26:741-751.
81. Masutani K., Katafuchi R., Uenoyama K., Saito S., Fujimi S. and Hirakata H. Brown. Predominance of Th1 immune response in diffuse proliferative lupus nephritis. *Arthritis Rheum.*, 2001;44:2097-2106.
82. Blom T., Franzen A., Heinegard D. and Holmdahl R. Comment on 'The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease.' *Science*, 2003;299:1845.
83. Zhao C., Fancy S., Constant C. and Franklin R . Osteopontin is extensively expressed by macrophages following CNS demyelination but has a redundant role in remyelination. *Neurobiol. of Disease*, 2008;31:209-217.
84. Mishima R., Takeshima F, Sawai T., Ohba K, Ohnita K., Isomoto H., Omagari K., Mizuta Y., Ozono Y. And Kohno S. High plasma osteopontin levels in patients with inflammatory bowel disease. *J. Clin.Gastroenterol.*, 2007;41:167-172.
85. Brucklacher-Waldert V., Stuermer K., Kolster M., Wolthausen J. and Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiplesclerosis. *Brain*. 2009;132:3329-41.
86. Kwan BC., Tam LS., Lai KB., Lai FM., Li EK., Wang G., Chow KM., Li PK. and Szeto CC. The gene expression of type 17 T-helper cell-related cytokines in the urinary sediment of patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 2009;48:1491-7.
87. Gaffen SL. The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Resp.*, 2009;11:365-70.
88. Bird L. Osteopontin: role in MS relapse. *Nature Immunology*, 2007,7:7.

89. Chiocchetti A., Comi C., Indelicato M., Castelli L., Mesturini R., Bensi T., Mazzarino MC., Giordano M., Momigliano-Richiardi P., Liguori M., Zorzon M., Amoroso A., Trojano M., Monaco F., Leone M., Magnani C. and Dianzani U. Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *The Jour. of Neuroimmunology*, 2005, 163:172-178.
90. D'Alfonso S., Barizzone N., Giordano M., Chiocchetti A., Magnani C., Castelli L., Indelicato M., Giacopelli F., Marchini M., Scorza R., Danieli MG., Cappelli M., Migliaresi S., Bigliardo B., Sabbadini MG., Baldissera E., Galeazzi M., Sebastiani GD., Minisola G., Ravazzolo R. Dianzani U., Momigliano-Richiardi P. Two single-nucleotide polymorphisms in the 5' and 3' ends of the osteopontin gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 2005;5:539-547.
91. Avalos BR., Kaufman SE., Tomonaga M., Williams RE., Golde DW. and Gasson JC. K562 produce cells and responde to human erythroid-potentiating activity. *Blood*, 1988;80:733-743.
92. Visse R. and Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases (structure, functions and biochemistry). *Circulation Reserch*, 2003;92:827-839.
93. Goetzl EJ., Banda MJ. and Leppert D. Matrix metalloproteinases and immunity. *J. Immunol.*, 1996;87:5578-5582.
94. Lambert E., Boudot C., Kadri Z., Soula-Rothhut M., Sowa ML., Mayeux P., Hornebeck W., Haye B. and Petitfrere E. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signalling pathway leading to erythroid cell survival. *Biochem. J.*, 2003;372:767-774.
95. Baker A., Edwards DR. and Murphy G. Metalloproteinases inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of cell science*, 2002;115:3719-3727.
96. Baratelli FE., Heuzè-Vourc'h N., Krysan K., Dohadwala M., Riedl K., Sharma S. and Dubinett SM. Prostaglandin E2-Dependent enhancement of tissue inhibitors of metalloproteinases-1 production limits dendritic cells migration through extracellular matrix. *J. Immunol.*, 2004;173:5458-5466.
97. Lacraz S., Nicod LP., Chicheportiche R., Welgus HG. and Dayer JM IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *The Journal of Clinical Investig.*, 1995;96:2304-2310.
98. Chirco R., Liu XW., Jung K. and Choi-Kim HR. Novel functions of TIMPs in cell signalling. *Cancer Metastasis Rev.*, 2006;25:99-113.
99. Levy S. and Shoham T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat. Immunol.*, 2005;5:136-148.
100. Pols MS, Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res.*, 2009;315:1584-92.

101. Mantegazza A., Barrio M., Moutel S., Bover L., Weck M., Brossart P., Teillaud J. and Mordoh J. CD63 tetraspanin slows down cell migration and translocate to the endosomal-lysosomal -MIICs route after extracellular stimuli in immature dendritic cells. *Blood*, 2004;104:1183-1190.
102. Jung K., Liu X., Chirco R., Fridman R. and Kim H. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *The EMBO Journ.*, 2006;25:3934-3942.
103. Pfistershammer K., Majdic O., Stöckl J., Zlabinger G., Kirchberger S., Steinberger P. and Knapp W. CD63 as an activation-linked T cell costimulator element. *J. Immunol.*, 2004;173:6000-8.
104. Ogier C., Creidy R., Boucraut J., Soloway PD., Kherestchatisky M. and Rivera S. Astrocyte reactivity to Fas activation is attenuated in TIMP-1 deficient mice, an in vivo study. *BMC Neuroscience*, 2005;6:68-80.
105. Crocker SJ., Whitmire JK., Frausto RF., Chertboonmuang P., Soloway PD., Whitton JL. and Campbell IL. Persistent macrophage/microglial activation and myelin disruption after experimental autoimmune encephalomyelitis in Tissue inhibitors of metalloproteinase 1-deficient mice. *The American journal of Pathology*, 2006;169:2104-2116.
106. Kachra Z., Beaulieu E., Delbecchi L., Mousseau N., Berthelet F., Moundjian R., Del Maestro R. And Beliveau R. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human brain tumors. *Clin Exp Metastasis*, 1999;17:555-66.
107. Chromek M., Tullus K., Lundhal J. and Brauner A. Tissue inhibitors of metalloproteinase 1 activates normal human granulocytes, protects them from apoptosis, and blocks their transmigration during inflammation. *Infection and Immunity*, 2004;72:82-88.
108. Jourquin J., Tremblay E., Bernard A., Charton G., Chaillan FA., Marchetti E., Roman FS., Soloway PD., Dive V., Yiotakis A., Khrestchatisky M. and Rivera S. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) modulates neuronal death, axonal plasticity, and learning and memory. *Eur. J. Neurosci.*, 2005;22:2569-78.
109. Li GR., Fridman R. and Choi Kim HR. Tissue inhibitors of metalloproteinase 1 inhibits apoptosis in human breast epithelial cell. *Cancer Res.*, 1999; 59:6267-6275.
110. Okuyama S., Komatsuda A., Wakui H., Aiba N., Fujishima N., Iwamoto K., Ohtani H. and Sawada KI. Up-regulation of TRAIL mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with minimal-change nephrotic syndrome. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2005;20:539-544.

111. Taube ME., Liu XW., Fridman R. and Choi Kim HR. TIMP-1 regulation of cell cycle in human breast epithelial cells via stabilization of p27<sup>Kip1</sup> protein. *Oncogene*, 2006; 25:3041-3048.
112. Guedez L, Stetler-Stevenson WG., Wolff L., Wang J., Fukushima P., Mansoor A. and Stetler-Stevenson M. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *The Journal of Clinical Investig.*, 1998;102:2002-10.
113. Guedez L., Stetler-Stevenson WG., Wolff L., Wang J., Fukushima P., Mansoor A. and Stetler-Stevenson M. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitors of metalloproteinase 1. *The Journal of Clinical Investig.*, 1998, 102;2002-2010.
114. Oelmann E., Herbst H., Zuhlsdorf M., Albrecht O., Nolte A., Schmitzmann C., Manzke O., Dieh V., Stein H. and Berdel WE. Tissue inhibitors of metalloproteinase 1 is an autocrine and paracrine survival factor, with additional immune-regulatory functions, expressed by Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood*, 2002;99:258-267.
115. Guedez L., Martinez A., Zhao S., Viveto A., Pittalunga S., Stevenson MS., Raffeld M. and Stevenson WGS. Tissue inhibitors of metalloproteinase 1 (TIMP-1) promotes plasmablastic differentiation of a Burkitt lymphoma cell line: implication in the pathogenesis of plasmacytic/plasmablastic tumors. *Blood*, 2005;105:166-1668.
116. Gaudin P., Trocme C., Berthier S., Kieffer S., Boutonnat J., Lamy C., Surla A., Garin J. and Morel F. TIMP-1/MMP-9 imbalance in an EBV-immortalized B lymphocyte cellular model: evidence for TIMP-1 multifunctional properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000;1499:19-33.
117. Ritter LM., Garfield SH. And Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinase 1 (TIMP-1) binds to the cell surface and translocates to the nucleus of human MCF-7 breast carcinoma cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999;257:494-499.
118. Jiang H., Zhu H., Chen X., Peng Y., Wang J., Liu F., Shi S., Fu B., Lu Y., Hong Q., Feng Z., Hou K., Sun X., Cai G., Zhang X. and Xie Y. TIMP-1 transgenic mice recover from diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin. *Diabetes*, 2007;5:49-56.
119. Matache C., M. Stefanescu C., Dragomir S., Tanaseanu A., Onu A., Ofiteru and Szegli G. Matrix metalloproteinase-9 and its natural inhibitor TIMP-1 expressed or secreted by peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J. of Autoimm.*, 2003;20:323-331.

120. Ozenci V., Rinaldi L., Teleshova N., Matusевич D., Kivisakk P., Kouwenhoven M  
Metalloproteinases and their tissue inhibitors in multiple sclerosis *J. of Autoimm.*,  
1999;12:297-303.
121. Thorne M., Moore CS. And Robertson GS. Lack of TIMP-1 increases severity of  
experimental autoimmune encephalomyelitis: Effects of darbepoetin alfa on TIMP-1  
null and wild-type mice. *J. Neuroimmunol.*, 2009;211:92-100.
122. Bokarewa M., Dahlberg L. and Tarkowski A. Expression and functional properties  
of antibodies to tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in rheumatoid  
arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2005;7:1014-22.
123. Alberti C., Brun-Buisson C., Burchardi H., Martin C., Goodman S., Artigas A.,  
Sicignano A., Palazzo M., Moreno R., Boulmé R., Lepage E. and Le Gall R.  
Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international  
multicentre cohort study. *Intensive Care Med.*, 2002;28:108-21.
124. Leibovici L., Shraga I., Drucker M., Konigsberger H., Samra Z. and Pitlik SD. The  
benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream  
infection. *J Intern. Med.*, 1998;244:379-86.
125. Cohen J. and Carlet J. INTERSEPT: an international, multicenter, placebo-controlled  
trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor-alpha in patients with  
sepsis. International Sepsis Trial Study Group. *Crit. Care Med.*, 1996;24:1431-1440.
126. Fisher CJ. Jr, Dhainaut JF., Opal SM., Pribble JP., Balk RA., Slotman GJ., Iberti TJ.,  
Rackow EC., Shapiro MJ., Greenman RL., et al. Recombinant human interleukin 1  
receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a  
randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis  
Syndrome Study Group. *JAMA*, 1994;271:1836-43.
127. Takahashi F, Takahashi K, Shimizu K et al. Osteopontin is strongly expressed by  
alveolar macrophages in the lungs of acute respiratory distress syndrome. *Lung*,  
2004;182:173-185.
128. Mishima R., Takeshima F., Sawai T., Ohba K., Ohnita K., Isomoto H., Omagari K.,  
Mizuta Y., Ozono Y. and Kohno S. High plasma osteopontin levels in patients with  
inflammatory bowel disease. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2007;41:167-72.
129. Wong CK., Lit LC., Tam LS., Li EK. and Lam CW. Elevation of plasma osteopontin  
concentration is correlated with disease activity in patients with systemic lupus  
erythematosus. *Rheumatology*, 2005;44:602-606.
130. Inomata S., Shijubo N., Kon S., Maeda M., Yamada G., Sato N., Abe S. and Uede T.  
Circulating interleukin-18 and osteopontin are useful to evaluate disease activity in  
patients with tuberculosis. *Cytokine*, 2005;30:203-11.

131. Knaus WA., Draper EA., Wagner DP. and Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med.*, 1985;13:818-829.
132. Vincent JL., Moreno R., Takala J., Willatts S., De Mendonça A., Bruining H., Reinhart CK., Suter PM. and Thijs LG. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.*, 1996;22:707-10.
133. Jain S., Chakraborty G., Bulbule A., Kaur R. and Kundu GC. Osteopontin: an emerging therapeutic target for anticancer therapy. *Expert. Opin. Ther. Targets*, 2007;11:81-90.
134. Vogt MH., Lopatinskaya L., Smits M., Polman CH. and Nagelkerken L. Elevated osteopontin levels in active relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann. Neurol.*, 2003;53:819-822.
135. Nau GJ., Chupp GL., Emile JF., Jouanguy E., Berman JS., Casanova JL. and Young RA. Osteopontin expression correlates with clinical outcome in patients with mycobacterial infection. *Am. J. Pathol.*, 2000;157:37-42.
136. Zhao L., Li T., Wang Y., Pan Y., Ning H., Hui X., Xie H., Wang J., Han Y., Liu Z. and Fan D. Elevated plasma osteopontin level is predictive of cirrhosis in patients with hepatitis infection. *Int. J. Clin. Pract.*, 2008;62:1056-62.
137. Tang BM., Eslick GD., Craig JC. and McLean AS. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.*, 2007;7:210-217.
138. Harbarth S., Holeckova K., Froidevaux C., Pittet D., Ricou B., Grau GE., Vadas L. and Pugin J. Geneva Sepsis Network. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001;164:396-402.
139. Resch B., Gusenleitner W. and Muller WD. Procalcitonin and interleukin-6 in the diagnosis of early-onset sepsis of the neonate. *Acta Paediatr.*, 2003;92:243-245.
140. Akira S., Isshiki H., Sugita T., Tanabe O., Kinoshita S., Nishio Y., Nakajima T., Hirano T. and Kishimoto T. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.*, 1990;9:1897-906.
141. O'Regan AW., Hayden JM., Body S., Liaw L., Mulligan N., Goetschkes M. and Berman JS. Abnormal pulmonary granuloma formation in osteopontin-deficient mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001;164:2243-7.
142. Persy VP., Verhulst A., Ysebaert DK., De Greef KE. and De Broe ME. Reduced postischemic macrophage infiltration and interstitial fibrosis in osteopontin knockout mice. *Kidney Int.*, 2003;63:543-553.



143. Nau GJ., Liaw L., Chupp GL., Berman JS., Hogan BL. and Young RA. Attenuated host resistance against *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice lacking osteopontin. *Infect. Immun.*, 1999;67:4223-4230.
144. Mateo V., Ménager M., de Saint-Basile G., Stolzenberg MC., Roquelaure B. and André N. Perforin-dependent apoptosis functionally compensates Fas deficiency in activation-induced cell death of human T lymphocytes. *Blood.* 2007; 110:4285-92.
145. Dono M., Zupo S., Augliera A., Burgio VL., Massara R., Melagrana A., Costa M., Grossi CE., Chiorazzi N. and Ferrarini M. Subepithelial B cells in the human palatine tonsil. Functional characterization. *Eur. J. Immunol.*, 1996;26:2043-49.
146. Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J. Cell. Sci.*, 1994;107:2373-9.
147. Stepp SE., Dufourcq-Lagelouse R., Le Deist F., Bhawan S., Certain S., Mathew PA., Henter JI., Bennett M., Fischer A., de Saint Basile G. and Kumar V. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science*, 1999;286:1957-9.
148. Feldmann J., Le Deist F., Ouachée-Chardin M., Certain S., Alexander S., Quartier P., Haddad E., Wulffraat N., Casanova JL., Blanche S., Fischer A. and de Saint Basile G. Functional consequences of perforin gene mutations in 22 patients with familial haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br. J. Haematol.*, 2002;117:965-72.
149. Fadeel B., Orrenius S. and Henter JI. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: too little cell death can seriously damage your health. *Leuk. Lymphoma*, 2001;42:13–20.
150. Indelicato M., Chiarenza V., Libra M., Malaponte G., Bevelacqua V., Marchini M., McCubrey JA., Stivala F., Scorza R. and Mazzarino MC. Analysis of TIMP-1 gene polymorphisms in Italian sclerodermic patients. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2006;20:173-6.
151. Lambert E., Dasse E., Haye B. and Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2004;49:187-198.
152. Jinnin M., Ihn H., Yamane K., Asano Y., Yazawa N. and Tamaki K. Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and 2 in patients with eosinophilic fasciitis. *Br. J. Dermatol.*, 2004;151:407-412.

Rosanna Vaschetto  
Stefania Nicola  
Carlo Olivieri  
Elena Boggio  
Fabio Piccolella  
Riccardo Mesturini  
Federica Damnotti  
Davide Colombo  
Paolo Navalesi  
Francesco Della Corte  
Umberto Dianzani  
Annalisa Chiochetti

## Serum levels of osteopontin are increased in SIRS and sepsis

Received: 29 March 2008  
Accepted: 23 August 2008  
Published online: 20 September 2008  
© Springer-Verlag 2008

This article is discussed in the editorial available at: doi:10.1007/s00134-008-1275-5.

R. Vaschetto · C. Olivieri · F. Piccolella · F. Damnotti · D. Colombo · P. Navalesi · F. Della Corte  
Department of Clinical and Experimental Medicine, SCU Anaesthesia and Intensive Care 1, Maggiore della Carità Hospital, "A. Avogadro" University of Eastern Piedmont, Novara, Italy

S. Nicola · E. Boggio · R. Mesturini · U. Dianzani (✉) · A. Chiochetti  
Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD) and Department of Medical Science, "A. Avogadro" University of Eastern Piedmont, Via Solaroli 17, 28100 Novara, Italy  
e-mail: dianzani@med.unipmn.it  
Tel.: +39-0321-660644  
Fax: +39-0321-620421

**Abstract Objective:** In sepsis, dysregulation of the immune response leads to rapid multiorgan failure and death. Accurate and timely diagnosis is lifesaving and should discriminate sepsis from the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) caused by non-infectious agents. Osteopontin acts as an extracellular matrix component or a soluble cytokine in inflamed tissues. Its exact role in immune response and sepsis remains to be elucidated. Therefore, we investigated the role of osteopontin in SIRS and sepsis.

**Design:** Prospective, observational study. **Setting:** Intensive care unit of a university hospital. **Patients and participants:** Fifty-six patients with SIRS or sepsis and 56 healthy subjects were enrolled.

**Interventions:** We analyzed the serum levels of osteopontin and TH1–TH2 cytokines and investigated the role of osteopontin on interleukin 6 secretion by monocytes. **Measurements and main results:** Serum

osteopontin levels were strikingly higher in patients than in controls and in sepsis than in SIRS, and decreased during the resolution of both the disorders. Receiver operating characteristic curves showed that osteopontin levels have discriminative power between SIRS and sepsis with an area under the curve of 0.796. Osteopontin levels directly correlated with those of interleukin 6 and in vitro, recombinant osteopontin increased interleukin 6 secretion by monocytes in both the absence and presence of high doses of lipopolysaccharide. **Conclusion:** These data suggest that osteopontin might be a mediator involved in the pathogenesis of SIRS and sepsis, possibly by supporting interleukin 6 secretion. **Descriptor:** 45. SIRS/Sepsis: clinical studies.

**Keywords** Immunity · Inflammation · Cytokine · Sepsis

### Introduction

Sepsis is characterized by signs of systemic inflammation and its most serious forms, i.e., severe sepsis and septic shock (SS/SS), are a major cause of morbidity and mortality in intensive care unit (ICU) [1]. Sepsis must be distinguished from the non-infectious systemic inflammatory response syndrome (SIRS) induced by agents such as trauma and ischemia causing extensive tissue injury.

Discrimination between SIRS and sepsis is crucial to promptly establish appropriate treatments in critically ill patients, since therapies and outcomes greatly vary in patients with and without infection [2]. Early detection of sepsis, however, is not easy and no single clinical or biological indicator has so far won unanimous acceptance.

The pathogenesis of both SIRS and sepsis is only partially defined, but a key role is ascribed to systemic

inflammation with overwhelming production of several inflammatory cytokines [i.e., tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)1, IL6 by many cell types (monocytes, macrophages, endothelial cells)]. The pro- and anti-inflammatory phases must be coordinated to mount a balanced effective defense that is not harmful for the host. Antagonists of IL1 and TNF- $\alpha$  have been used to counteract systemic inflammation, but they failed to improve the outcome and even display a detrimental effect [3, 4].

Osteopontin is a phosphoprotein with adhesive and cell-signaling functions involved in cell-cell and cell-matrix interactions crucial in the inflammatory response [5, 6]. It can act as either an extracellular matrix component in mineralized tissues or a soluble cytokine in inflamed tissues and serum. The exact role of osteopontin in vivo immune responses is partly unclear since it is believed to mainly act as a pro-inflammatory cytokine by chemoattracting monocytes/macrophages and modulating T cell function, but may also have some anti-inflammatory effects since it can inhibit nitric oxide production by macrophages in vitro and support tissue repair at sites of inflammation [7, 8]. Its tissue and serum levels are increased in diseases with either systemic or focal chronic inflammation, such as Crohn's disease [9], systemic lupus erythematosus [10], multiple sclerosis [11, 12] and tuberculosis [13], but little is known about its levels in acute inflammatory diseases [14]. Since osteopontin seems to be a key player in macrophage function and inflammation, this study investigated its levels in SIRS and sepsis to assess its involvement in the pathogenesis of these acute inflammatory diseases and its possible role as a marker of the disease status.

## Materials and methods

### Study population

We performed a prospective observational study on 56 consecutive patients (43 male, 13 female) admitted to the ICU of the Maggiore della Carità Hospital, Novara, Italy from May 2004 to May 2005. The study was approved by our institutional ethical committee; written informed consent was obtained from the patients or their legal representative.

Patients were enrolled when they met the criteria of SIRS or SS/SS [15]. Briefly, patients were considered to have SIRS if they met two or more of the following conditions: (1) temperature  $>38$  or  $<36^{\circ}\text{C}$ , (2) heart rate  $>90$  beats/min, (3) respiratory rate  $>20$  breaths/min or  $\text{PaCO}_2 <32$  mmHg, and (4) white blood cells count  $>12,000$  or  $<4,000/\mu\text{L}$ , or the presence of more than 10% immature neutrophils. Patients had sepsis when they developed SIRS as a result of infection [15]. Septic patients with organ dysfunction were considered to have

severe sepsis, and those with persisting hypotension, requiring vasopressor treatment, were considered to have septic shock. Clinical severity was evaluated by blood sampling with the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II and the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) scores by physicians blinded to the experimental results [16, 17].

The two groups consisted of 29 patients with SIRS and 27 with SS/SS. We also studied: (1) 56 healthy volunteers, defined as controls, matched for gender and age; (2) 21 patients in resolution from SIRS (14 patients) and SS/SS (7 patients). The resolution group comprised patients who no longer met the inclusion criteria of SIRS (i.e., displaying one or no inclusion criteria) [15].

### Samples collection

All blood samples were obtained within 6 h after patients were enrolled and met the criteria of SIRS or SS/SS [15]. For patients analyzed during the resolution phase, blood withdrawal was performed on the first day in which they lost the inclusion criteria for SIRS. In all patients and controls, serum was preferred over plasma to overcome the possible problems related to the influence of different basal coagulation activity on osteopontin levels.

### Monocytes isolation and culture

CD14<sup>+</sup> monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells by plastic adherence. To evaluate the dose-dependence of IL6 secretion, monocytes were plated at  $5 \times 10^5$  cells/mL in 48 well plates, activated or not with lipopolysaccharide at 25 ng/mL (*Escherichia coli*, serotype 055:B5; Sigma Chemicals Co., St Louis, MO) and cultured in the presence or absence of human recombinant osteopontin (rOPN) at 0.1, 0.5 or 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (R&D System, Minneapolis, MN). After 6 h, supernatants were harvested and cells were recovered for mRNA extraction. For time-course analysis, monocytes ( $10^5$  cells/mL in 96 well plates), were activated with lipopolysaccharide at 25 ng/mL and supernatants were harvested after 6, 24 and 48 h. Endotoxin level in rOPN preparations, was  $<1.0$  UE/ $\mu\text{g}$  of rOPN corresponding to 0.2 ng/ml. We compared IL6 secretion in monocytes ( $5 \times 10^5$  cells/mL in 48 well plates) treated with 0.2 ng/ml of lipopolysaccharide or rOPN (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or rOPN (1  $\mu\text{g}$ ) plus a neutralizing  $\alpha$ -OPN mAb (10  $\mu\text{g}$ ) (R&D System).

### Osteopontin and IL6 ELISA assay

Serum osteopontin and IL6 concentrations were evaluated in a capture enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's protocol (Assay

Designs Inc., Michigan; Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL) by investigators blinded to patient clinical condition.

#### T helper type (TH)1 and TH2 cytokine assay

A panel of TH1 and TH2 cytokines comprising IL2, IL4, IL5, IL10, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  were simultaneously quantified by the Human TH1/TH2 Cytokine Cytometric Bead Array Kit (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's protocol, using a flow cytometer (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA).

#### Real-time RT-PCR Assay

Total RNA was isolated from monocytes treated or not with different concentrations of rOPN for 6 h, using Nucleospin RNAII kit (Machery-Nagel, Germany). RNA (500 ng) was retrotranscribed by the ThermoScript<sup>TM</sup> RT PCR System (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and IL6 expression was determined with a commercial gene expression assay (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). The housekeeping gene HPRT was used to normalize for variations in cDNA. Real-time PCR was performed on 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem) in duplicate for each sample. The results were analyzed with a standard curve model.

#### Determination of necrosis and apoptosis

To estimate the level of necrosis during the time-course experiments, we evaluated the release of lactate dehydrogenase (LDH) in the supernatants after a 48 h culture, with the CytoTox-One<sup>TM</sup> Homogeneous Membrane Integrity Kit (Promega, Madison, USA) by following the manufacturer's instruction. In the same conditions, cells were harvested and stained with trypan blue evaluating live cells.

#### Statistical analysis

Mann–Whitney *U*-test and Wilcoxon's signed rank were used to analyze the unpaired or paired data, respectively. Comparison among groups was performed using Kruskal–Wallis test. When an overall  $p < 0.05$ , a Dunn's multiple-comparison post hoc analysis was conducted. Correlations were tested with Spearman's rho. A  $p$  value  $< 0.05$  was considered statistically significant. Data were analyzed by sensitivity and specificity derived from the receiver operating characteristic curve (ROC), and area under the curve (AUC) [18]. Statistical analysis was performed with GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) software.

## Results

### Study population

We analyzed 29 patients with SIRS and 27 with SS/SS admitted to the ICU of the Maggiore della Carità Hospital, Novara, Italy, and 56 healthy volunteers matched for gender and age, as controls. Moreover, 21 patients were also analyzed on the first day in which they lost the inclusion criteria for SIRS [15]. Baseline clinical features of the patients and microbiological findings are summarized in Tables 1 and 2, respectively. Clinical severity was evaluated using scores calculated according to the APACHE II system [16] and the SOFA system [17]. Both the scores were significantly different in SS/SS and SIRS patients ( $p < 0.0001$ ) (Table 1).

Serum osteopontin levels are elevated in patients with SIRS and SS/SS

Serum osteopontin levels were measured in patients and controls. Levels were strikingly higher in the patients

**Table 1** Demographics and clinical features by group

	SIRS <i>n</i> = 29	Severe sepsis/septic shock <i>n</i> = 27	Resolution <i>n</i> = 21
Age (years) <sup>a</sup>	48.2 ± 20.3	51.3 ± 20.8	51.7 ± 20.6
MF <sup>b</sup>	22/7	21/6	14/6
APACHE II <sup>c</sup>	12 (6–16) <sup>d</sup>	20 (18–24)	9 (5–11)
SOFA <sup>c</sup>	4 (3–7) <sup>d</sup>	12 (10–14)	3 (2–5)
ICU mortality <sup>b</sup>	3 (10%)	9 (33%)	0

<sup>a</sup> Results are shown as mean ± SD

<sup>b</sup> Results are shown as absolute numbers, proportions are in brackets

<sup>c</sup> Results are shown as median, interquartile ranges are shown in brackets

<sup>d</sup> Statistically different from severe sepsis/septic shock

**Table 2** Microbiological findings on enrollment in patients with severe sepsis/septic shock

Primary site of infection	
Lung	13 (48.1%) <sup>a</sup>
Abdomen	8 (29.6%)
Blood	2 (7.4%)
Other	4 (14.8%)
Microbiology	
Gram-negative	14 (51.8%)
Gram-positive	6 (22.2%)
Polybacterial	5 (18.5%)
Fungi	2 (7.4%)

<sup>a</sup> Results are shown as absolute numbers, proportions are in brackets



**Table 3** Levels of osteopontin, interleukin 6, interleukin 10

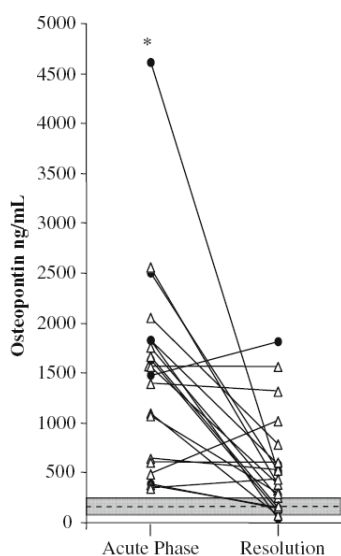
	Controls <i>n</i> = 56	All patients <i>n</i> = 56	SIRS <i>n</i> = 29	Severe sepsis/ septic shock <i>n</i> = 27	Survivors <i>n</i> = 44	Non-survivors <i>n</i> = 12
Osteopontin <sup>a</sup>	159 (104–208) <sup>b</sup>	1,653 (1,139–2,440)	1,396 (606–1,704) <sup>d</sup>	2,031 (1,556–3,557)	1,552 (966–2,032) <sup>c</sup>	2,410 (1,673–4,810)
IL6 <sup>a</sup>	5 (3–8) <sup>b</sup>	81 (39–199)	55 (29–105) <sup>d</sup>	130 (69–313)	72 (29–164)	107 (72–357)
IL10 <sup>a</sup>	Undetectable	20 (5–156)	8 (4–45)	36 (7–197)	6 (3–45)	34 (22–157)

<sup>a</sup> Median value (osteopontin: ng/mL; IL6 and IL10: ng/L), interquartile ranges are shown in brackets

<sup>b</sup> Significantly different from all patients,  $p < 0.001$ , Mann-Whitney

<sup>c</sup> Survivors level significantly different from non-survivors,  $p < 0.001$ , Mann-Whitney

<sup>d</sup> Significantly different from severe sepsis/septic shock,  $p < 0.01$ , Mann-Whitney



**Fig. 1** Serum osteopontin levels during resolution. Serum levels of osteopontin in patients with SIRS (triangles) or severe sepsis/septic shock (circles) evaluated in the acute and in the resolution phase. The gray box represents the median (horizontal dotted bar) and the 25th and 75th percentile of controls. \* $p < 0.05$ , Wilcoxon signed rank test

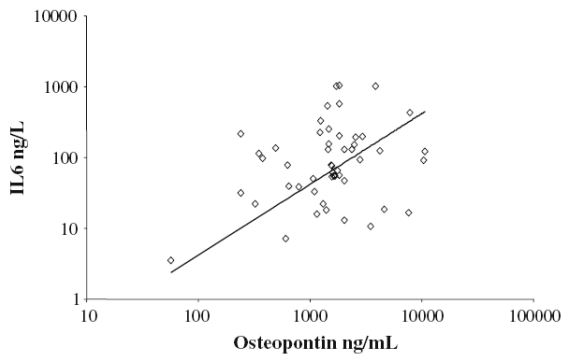
(median 1,653 ng/mL) than in the controls (median 159 ng/mL,  $p < 0.0001$ ) (Table 3). Moreover, they were significantly higher in SS/SS (median 2,031 ng/mL) than in SIRS (median 1,396 ng/mL,  $p < 0.001$ ) (Table 3) and seemed to be associated with the clinical outcome since they were significantly higher in non-survivors (median 2,410 ng/ml  $p < 0.01$ ) (Table 3) and displayed a direct correlation with clinical severity scores (APACHE II:  $r = 0.3858$ ,  $p < 0.01$ ; SOFA:  $r = 0.4759$ ,  $p < 0.001$ ). Furthermore, during the resolution phase, osteopontin levels significantly decreased (median 438 ng/mL) compared to the overt disease ( $p < 0.001$ ), but were still threefold higher than in the controls (Fig. 1).

### Serum cytokine profile

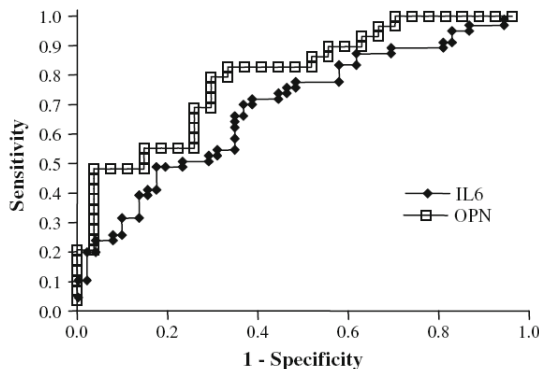
In the pathogenesis of SIRS and sepsis, a role has been suggested for both pro- and anti-inflammatory cytokines and for the balance between TH1 and TH2 responses. To draw a broader picture of the behavior of osteopontin within the global cytokine response, we evaluated the serum levels of IL6 and TNF- $\alpha$  (acute inflammation cytokines), IL2 and IFN- $\gamma$  (TH1 cytokines), and IL4, IL5 and IL10 (TH2 cytokines) in patients and controls. Few patients displayed detectable levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL2, IL4, and IL5 and no significant differences were found with controls (data not shown). By contrast, levels of IL6 (median 81 ng/L,  $p < 0.0001$ ) and IL10 (median 20 ng/L,  $p < 0.0001$ ) were higher in patients (Table 3), as already reported [19, 20]. These data also showed that IL6 but not IL10 levels were significantly higher in SS/SS than in SIRS (median 130 vs. 55 ng/L,  $p < 0.01$ ), whereas levels of both cytokines were higher in non-survivors compared to survivors patients, although only osteopontin levels reached statistical significance (Table 3). Osteopontin levels displayed a significant direct correlation with IL6 ( $r = 0.3033$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2), but not with IL10 (data not shown).

### Osteopontin and IL6 as markers of inflammation and sepsis

In view of the significant difference of osteopontin and IL6 levels in patients with SS/SS and those with SIRS, we used the receiver operator characteristics curve (ROC) to explore their ability to differentiate SS/SS and SIRS patients (Fig. 3) [18]. The AUC was 0.796 (95% CI 0.667–0.892,  $p = 0.0001$ ) for osteopontin and 0.727 for IL6 (95% CI 0.591–0.837,  $p = 0.0009$ ). For osteopontin, the optimal s value discriminating between SS/SS and SIRS (1,708 ng/mL) gave a sensitivity of 70% and specificity of 79% with a positive likelihood ratio of 3.40.



**Fig. 2** Correlation between serum osteopontin and interleukin 6. Osteopontin displayed a significant direct correlation with interleukin 6 levels in patients with systemic inflammatory response syndrome and severe sepsis/septic shock ( $r = 0.3033$ ,  $p < 0.05$ )



**Fig. 3** Receiver operating characteristic curves. Receiver operating characteristic curve evaluating the accuracy of osteopontin and interleukin 6 in differentiating patients with severe sepsis/septic shock and SIRS. The area under the curve was 0.796 (95% CI 0.667–0.892;  $p = 0.0001$ ) for osteopontin and 0.727 (95% CI 0.591–0.837;  $p = 0.0009$ ) for interleukin 6

#### Osteopontin induces IL6 secretion in resting and activated monocytes

The direct correlation between osteopontin and IL6 in the patients' sera raises the possibility that their production might be related. Therefore, we investigated the dose- and time-dependent effect of rOPN on IL6 secretion by monocytes.

Firstly, we performed titration experiments by treating monocytes with 0.1, 0.5, and 1  $\mu\text{g/ml}$  of rOPN, (i.e., a range comprising OPN median levels of controls and patients). After 6 h, IL6 was measured in the supernatants by ELISA and IL6 mRNA was measured in cell extracts by real-time PCR. Results showed that levels of both IL6 mRNA and secreted protein were increased by rOPN treatment in a dose dependent manner (Fig. 4a).

Secondly, we performed time-course experiments comparing the rOPN effect on IL6 secretion, in the presence or absence of lipopolysaccharide, to stimulate monocyte activation (Fig. 4b). Results showed that treatment with lipopolysaccharide induced secretion of high levels of IL6 (in the  $\mu\text{g/mL}$  range), which were already detectable after 6 h and increased after 24 and 48 h; this secretion was significantly increased by treatment with rOPN only at the 48 h time point. In the absence of lipopolysaccharide, rOPN induced secretion of low levels of IL6 (in the  $\text{ng/mL}$  range), but this effect was already detectable after 6 h of culture. The rOPN effect was not ascribable to modulation of monocytes death in culture, since LDH release and trypan blue exclusion test detected similar levels of cell death in all conditions (data not shown).

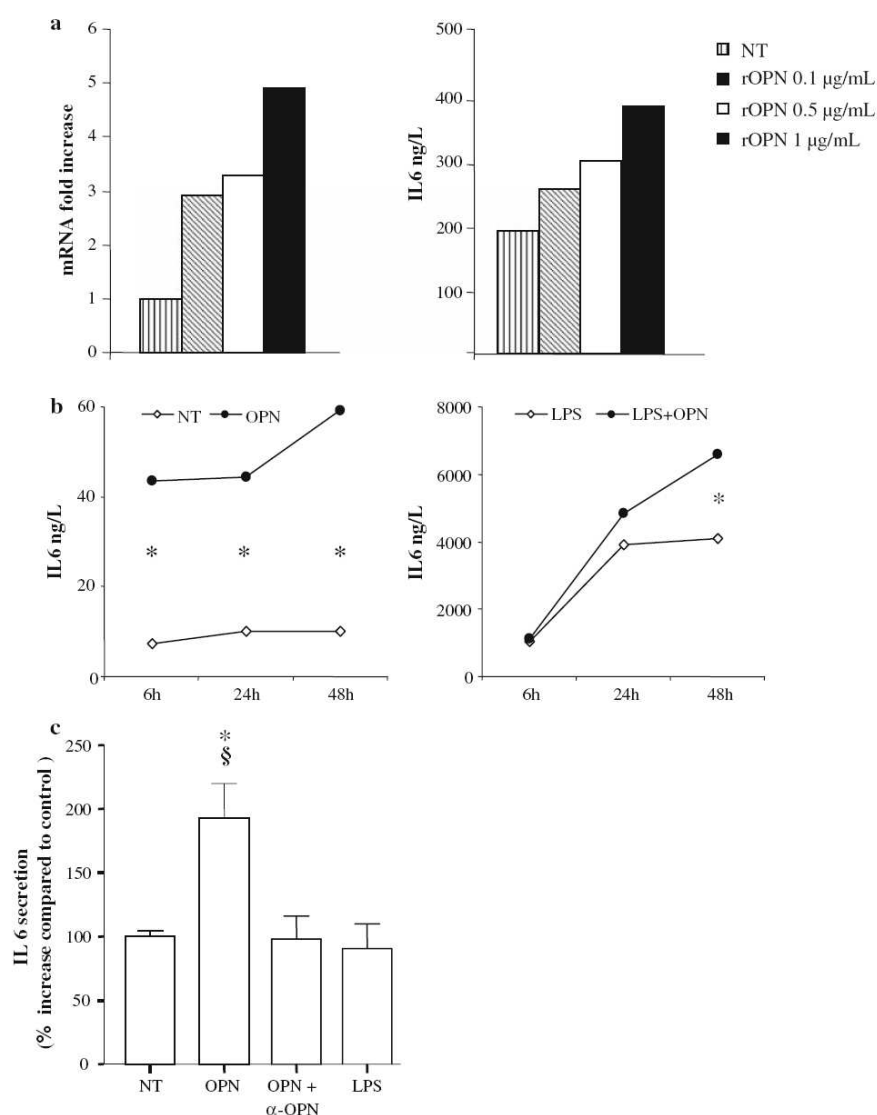
Lastly, we assessed the specificity of the rOPN effect to rule out if it was ascribable to the contaminant endotoxin ( $<0.2 \text{ ng endotoxin}/\mu\text{g rOPN}$ ) present in rOPN. To address this issue, we evaluated IL6 secretion induced by rOPN, in the presence or absence of anti-OPN neutralizing antibody (Fig. 4c). Results showed that addition of the neutralizing antibody abrogated the osteopontin-induced secretion of IL6. Moreover, we evaluated the effect on IL6 secretion of the maximal contaminant dose of endotoxin in the rOPN preparation. Results showed that no IL6 secretion was induced by the low doses of lipopolysaccharide alone (Fig. 4c) showing that the effect of rOPN is specific and not ascribable to contaminant endotoxin.

## Discussion

The main finding of this study is that serum osteopontin levels are high in SIRS and SS/SS and correlate with IL6 levels. It also suggests that high osteopontin levels could be used to discriminate between SIRS and SS/SS, and that osteopontin might be involved in the pathogenesis of systemic inflammation, possibly through its effect on macrophages and its ability to enhance their IL6 secretion.

Osteopontin is implicated in several physiological and pathological events, including cell-mediated immunity, inflammation, tumor progression, and cell survival [21–23]. Originally viewed as mainly involved in bone remodeling and tissue debridement, its critical involvement in both acute and chronic inflammation is now apparent [9–12, 14, 24–27].

We and others have reported increased osteopontin levels in chronic inflammatory diseases such as multiple sclerosis [11, 12], systemic lupus erythematosus [10, 28], mycobacterial infection [13, 25], and HBV-induced liver cirrhosis [27]. Fewer reports focus on acute inflammatory diseases. One has shown that osteopontin levels are



**Fig. 4** Osteopontin induces secretion of interleukin 6 by monocytes. **a** Interleukin 6 is induced by recombinant osteopontin (rOPN) in a dose dependent manner both at mRNA (*left panel*) and protein (*right panel*) level. **b** Time-course evaluating interleukin 6 secretion by monocytes treated with vehicle control (*left panel*) or with lipopolysaccharide (LPS) (*right panel*) (25 ng/mL) and cultured for 6, 24 and 48 h, in the presence and absence of 1  $\mu\text{g/mL}$  recombinant osteopontin. The significance of differences was determined with the

Wilcoxon signed rank test.  $*p < 0.05$ . **c** Interleukin 6 secretion in monocytes not treated (NT), or treated with recombinant osteopontin (1  $\mu\text{g/mL}$ ), recombinant osteopontin and osteopontin neutralizing antibody (10  $\mu\text{g/mL}$ ) or lipopolysaccharide (LPS) (0.2 ng/mL).  $*p < 0.01$  compared to lipopolysaccharide or untreated cells (NT);  $§p < 0.01$  compared to sample with neutralizing antibody ( $\alpha$  OPN) using Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s multiple-comparison test

increased in patients with acute liver dysfunction [14]. In all these inflammatory diseases, osteopontin levels seem to be a good marker of the host response, since they increase in function of severity.

In this study, we found that serum osteopontin levels were tenfold higher in patients with SIRS or SS/SS than in the controls. They were also higher in SS/SS than in SIRS, and decreased with the resolution of both the

conditions. Evaluation of osteopontin levels may thus be useful in monitoring the status and progression of these forms of systemic inflammation. Two of our findings indicate that osteopontin levels could be used to discriminate between SIRS and sepsis. Firstly, most septic patients (17/27, 63%) displayed higher osteopontin levels than the 75th percentile limit displayed by patients with SIRS (1,704 ng/mL). Secondly, the diagnostic accuracy of osteopontin in discriminating SIRS from SS/SS, as evaluated from the ROC curve, was similar to that reported in a recent meta-analysis for procalcitonin [29] and IL6 [19], i.e., the main serum protein markers currently used to monitor systemic inflammation.

The role of procalcitonin in the immune response is still poorly understood [30]. Its serum levels have been shown to correlate with the infection severity in sepsis. Even so, it is increasingly evident that procalcitonin does not provide a definitive diagnosis of sepsis [19, 31, 32] and its ability to discriminate sepsis from SIRS has been disproved [29, 32–34].

IL6 is believed to play a key role in sepsis through its effect on inflammation and the acute phase response. It is the most commonly used cytokine marker in the clinical setting of SIRS/sepsis [35, 36] and several studies have shown that high levels correlate with infection in adult patients. However, it seems no better than procalcitonin in the diagnosis of sepsis because it displays lower sensitivity and specificity [19]. Osteopontin levels could thus supplement the information given by procalcitonin and IL6.

A different issue is the role played by osteopontin in the pathogenesis of systemic inflammation. The direct correlation between the serum osteopontin and IL6 levels in SIRS and SS/SS suggests that these cytokines may be functionally related. One possibility is that their secretion is coordinated by the responsiveness to the same stimuli, especially since the osteopontin and IL6 genes share responsiveness to the transcription factor NF-IL6 involved in the acute phase response and macrophage activation [37]. However, our *in vitro* experiments suggest that osteopontin may also directly promote IL6 secretion, since rOPN induced mRNA expression and stimulated IL6 secretion by monocytes. A functional interaction between osteopontin and monocyte/macrophages is intriguing since these cells are activated by both necrotic cells and microbial

endotoxins, and are believed to play a pivotal role in SIRS/sepsis. It is also intriguing that rOPN enhanced IL6 secretion in both the presence and the absence of high doses of lipopolysaccharide added to the cultures to mimic severe bacterial infections. Since our rOPN preparations contained low doses of contaminant endotoxin, these results do not prove that osteopontin is *per se* capable to induce IL6 secretion in the absence of monocyte-activating agents, but suggest that it may support the systemic inflammatory response even in the presence of limited amounts of these agents. This could be particularly relevant for sepsis under effective antibiotic therapy and SIRS.

The prominence of the functional interaction between osteopontin and macrophages is highlighted by data on osteopontin-deficient mice showing that osteopontin attracts to the injury sites and supports their survival [5, 7, 38, 39]. For instance, these mice show a markedly reduced macrophage infiltration in ischemic kidneys and an enhanced rate of apoptosis during the injury phase of acute renal failure [39]. Moreover, they display increased susceptibility to mycobacterial infections in which macrophages play a key role [40].

Our study did not investigate the source of osteopontin in SIRS/sepsis, but many OPN-producing cells present in injured and inflamed tissues may be involved since OPN is constitutively expressed by bone cells and several epithelial tissues, and is expressed upon activation by endothelial cells, macrophages, smooth muscle cells, NK cells, and activated T cells [5, 23].

In conclusion, our data show that osteopontin is strongly up-regulated during SIRS and sepsis and correlates with IL6 levels. Furthermore, they show that osteopontin induces IL6 release and enhances lipopolysaccharide-induced IL6 release by monocytes *in vitro*. To ascertain whether osteopontin offers a clinically relevant advantage over the markers currently used for diagnosis and monitoring of SIRS/sepsis, further studies with a higher number of patients are needed.

**Acknowledgments** This work was partially supported by Telethon grant E1170 (Rome), AIRC (Milan), PRIN Project (MIUR, Rome), Compagnia di San Paolo (Turin), Regione Piemonte (Ricerca Sanitaria Finalizzata Project and Ricerca Sanitaria Applicata-CIPE Project), FISM 2005/R/10 (Genoa), Ricerca Corrente Ministeriale (Rome), Fondazione CARIPLO (Milan).

## References

1. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulme R, Lepage E, Le GR (2002) Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 28:108–121
2. Leibovici L, Shraga I, Drucker M, Konigsberger H, Samra Z, Pitlik SD (1998) The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection. *J Intern Med* 244:379–386
3. Cohen J, Carlet J (1996) INTERSEPT: an international, multicenter, placebo-controlled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor- $\alpha$  in patients with sepsis. International Sepsis Trial Study Group. *Crit Care Med* 24:1431–1440



4. Fisher CJ Jr, Dhainaut JF, Opal SM, Pribble JP, Balk RA, Slotman GJ, Iberti TJ, Rackow EC, Shapiro MJ, Greenman RL et al (1994) Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA* 271:1836–1843
5. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, Cantor H (2000) Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 287:860–864
6. Gravallesse EM (2003) Osteopontin: a bridge between bone and the immune system. *J Clin Invest* 112:147–149
7. Rollo EE, Laskin DL, Denhardt DT (1996) Osteopontin inhibits nitric oxide production and cytotoxicity by activated RAW264.7 macrophages. *J Leukoc Biol* 60:397–404
8. Takahashi F, Takahashi K, Shimizu K, Cui R, Tada N, Takahashi H, Soma S, Yoshioka M, Fukuchi Y (2004) Osteopontin is strongly expressed by alveolar macrophages in the lungs of acute respiratory distress syndrome. *Lung* 182:173–185
9. Mishima R, Takeshima F, Sawai T, Ohba K, Ohnita K, Isomoto H, Omagari K, Mizuta Y, Ozono Y, Kohno S (2007) High plasma osteopontin levels in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 41:167–172
10. Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Lam CW (2005) Elevation of plasma osteopontin concentration is correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 44:602–606
11. Chiocchetti A, Comi C, Indelicato M, Castelli L, Mesturini R, Bensi T, Mazzarino MC, Giordano M, D'Alfonso S, Momigliano-Richiardi P, Liguori M, Zorzon M, Amoroso A, Trojano M, Monaco F, Leone M, Magnani C, Dianzani U (2005) Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *J Neuroimmunol* 163:172–178
12. Vogt MH, Lopatinskaya L, Smits M, Polman CH, Nagelkerken L (2003) Elevated osteopontin levels in active relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol* 53:819–822
13. Inomata S, Shijubo N, Kon S, Maeda M, Yamada G, Sato N, Abe S, Uede T (2005) Circulating interleukin 18 and osteopontin are useful to evaluate disease activity in patients with tuberculosis. *Cytokine* 30:203–211
14. Arai M, Yokosuka O, Kanda T, Fukai K, Imazeki F, Muramatsu M, Seki N, Miyazaki M, Ochiai T, Hirasawa H, Saisho H (2006) Serum osteopontin levels in patients with acute liver dysfunction. *Scand J Gastroenterol* 41:102–110
15. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 20:864–874
16. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE (1985) APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 13:818–829
17. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, de MA, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG (1996) The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 22:707–710
18. Metz CE, Herman BA, Shen JH (1998) Maximum likelihood estimation of receiver operating characteristic (ROC) curves from continuously-distributed data. *Stat Med* 17:1033–1053
19. Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, Vadas L, Pugin J (2001) Diagnostic value of procalcitonin, interleukin 6, and interleukin 8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 164:396–402
20. Oberholzer A, Souza SM, Tschöcke SK, Oberholzer C, Abouhamze A, Pribble JP, Moldawer LL (2005) Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock* 23:488–493
21. Jain S, Chakraborty G, Bulbule A, Kaur R, Kundu GC (2007) Osteopontin: an emerging therapeutic target for anticancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 11:81–90
22. Jansson M, Panoutsakopoulou V, Baker J, Klein L, Cantor H (2002) Cutting edge: attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in eta-1/osteopontin-deficient mice. *J Immunol* 168:2096–2099
23. O'Regan AW, Nau GJ, Chupp GL, Berman JS (2000) Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. *Immunol Today* 21:475–478
24. Comabella M, Pericot I, Goertsches R, Nos C, Castillo M, Blas NJ, Rio J, Montalban X (2005) Plasma osteopontin levels in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 158:231–239
25. Nau GJ, Chupp GL, Emile JF, Jouanguy E, Berman JS, Casanova JL, Young RA (2000) Osteopontin expression correlates with clinical outcome in patients with mycobacterial infection. *Am J Pathol* 157:37–42
26. Yamaguchi H, Igarashi M, Hirata A, Tsuchiya H, Sugiyama K, Morita Y, Jimbu Y, Ohnuma H, Daimon M, Tominaga M, Kato T (2004) Progression of diabetic nephropathy enhances the plasma osteopontin level in type 2 diabetic patients. *Endocr J* 51:499–504
27. Zhao L, Li T, Wang Y, Pan Y, Ning H, Hui X, Xie H, Wang J, Han Y, Liu Z, Fan D (2008) Elevated plasma osteopontin level is predictive of cirrhosis in patients with hepatitis B infection. *Int J Clin Pract* 62(7):1056–1062
28. D'Alfonso S, Barizzone N, Giordano M, Chiocchetti A, Magnani C, Castelli L, Indelicato M, Giacomelli F, Marchini M, Scorza R, Danieli MG, Cappelli M, Migliaresi S, Bigliardi B, Sabbadini MG, Baldissera E, Galeazzi M, Sebastiani GD, Minisola G, Ravazzolo R, Dianzani U, Momigliano-Richiardi P (2005) Two single-nucleotide polymorphisms in the 5' and 3' ends of the osteopontin gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52:539–547
29. Tang BM, Eslick GD, Craig JC, McLean AS (2007) Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 7:210–217
30. Meisner M (2002) Pathobiochemistry and clinical use of procalcitonin. *Clin Chim Acta* 323:17–29
31. Giamarellos-Bourboulis EJ, Mega A, Grecka P, Scarpa N, Koratzanis G, Thomopoulos G, Giamarellou H (2002) Procalcitonin: a marker to clearly differentiate systemic inflammatory response syndrome and sepsis in the critically ill patient? *Intensive Care Med* 28:1351–1356
32. Ruokonen E, Ilkka L, Niskanen M, Takala J (2002) Procalcitonin and neopterin as indicators of infection in critically ill patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 46:398–404
33. Tugrul S, Esen F, Celebi S, Ozcan PE, Akinci O, Cakar N, Telci L (2002) Reliability of procalcitonin as a severity marker in critically ill patients with inflammatory response. *Anaesth Intensive Care* 30:747–754

- 
34. Wanner GA, Keel M, Steckholzer U, Beier W, Stocker R, Ertel W (2000) Relationship between procalcitonin plasma levels and severity of injury, sepsis, organ failure, and mortality in injured patients. *Crit Care Med* 28:950–957
35. Doellner H, Arntzen KJ, Haereid PE, Aag S, Austgulen R (1998) Interleukin 6 concentrations in neonates evaluated for sepsis. *J Pediatr* 132:295–299
36. Resch B, Gusenleitner W, Muller WD (2003) Procalcitonin and interleukin 6 in the diagnosis of early-onset sepsis of the neonate. *Acta Paediatr* 92:243–245
37. Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T (1990) A nuclear factor for IL6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J* 9:1897–1906
38. O'Regan AW, Hayden JM, Body S, Liaw L, Mulligan N, Goetschkes M, Berman JS (2001) Abnormal pulmonary granuloma formation in osteopontin-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 164:2243–2247
39. Persy VP, Verhulst A, Ysebaert DK, De Greef KE, De Broe ME (2003) Reduced postischemic macrophage infiltration and interstitial fibrosis in osteopontin knockout mice. *Kidney Int* 63:543–553
40. Nau GJ, Liaw L, Chupp GL, Berman JS, Hogan BL, Young RA (1999) Attenuated host resistance against *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice lacking osteopontin. *Infect Immun* 67:4223–4230

# ROLE OF TIMP-1 IN DEVELOPMENT OF AUTOIMMUNITY/LYMPHOPROLIFERATION

## Original Article

Elena Boggio, MS<sup>a</sup>, Manuela Indelicato, MS<sup>b</sup>, Elisabetta Orilieri, PhD<sup>a</sup>, Sara Bocca, MS<sup>a</sup>, Riccardo Mesturini, PhD<sup>a</sup>, Chiara Sarasso, MS<sup>a</sup>, Maria Clorinda Mazzarino, MS<sup>c</sup>, Maria Francesca Campagnoli, MD<sup>d</sup>, Ugo Ramenghi, MD<sup>d</sup>, Umberto Dianzani, PhD, MD<sup>a</sup> and Annalisa Chiocchetti, PhD, MD<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD) and Department of Medical Sciences, “A. Avogadro” University of Eastern Piedmont, Novara, Italy

<sup>b</sup>Department of Cellular and Molecular Pathology, IRCCS San Raffaele Pisana, Rome, Italy

<sup>c</sup>Department of Biomedical Sciences, University of Catania, Catany, Italy

<sup>d</sup>Department of Pediatrics, University of Turin, Turin, Italy

## Corresponding author

Prof. Umberto Dianzani

Department of Medical Science

University of Eastern Piedmont “A. Avogadro”

via Solaroli 17, I-28100 Novara, Italy

Tel. ++39-0321-660658

Fax ++39-0321-620421

E-Mail: dianzani@med.unipmn.it

Declaration of all sources of funding: This study was partly supported by research funding from AIRC (Milano), Compagnia di San Paolo (Torino), Fondazione Amici di Jean (Torino), FISM (Genova), Fondazione Cassa di Risparmio di Cuneo (Cuneo) to UD and Regione Piemonte (Ricerca Sanitaria Finalizzata Project and Ricerca Sanitaria Applicata-CIPE Project) to UD and AC.

## **Abstract**

**Background:** Inherited defects decreasing function of the Fas death receptor cause the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) with autoimmune manifestations, spleen/lymph node enlargement, and expansion of CD4/CD8-negative T cells. Diansani Autoimmune Lymphoproliferative Disease (DALD) is a similar picture, but lacks this expansion. A cDNA array analysis of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from a DALD patient detected striking overexpression of Osteopontin (OPN) and Tissue Inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1). Previous work on OPN had detected increased serum levels in DALD patients, associated with variations of its gene.

**Objective:** Aim of this work was to extend the analysis to TIMP-1.

**Methods:** TIMP-1 levels were evaluated by ELISA in sera and culture supernatants, and by Real Time PCR in cell lysates. The TIMP-1 gene was sequenced from genomic DNA. Activation- (AICD) and Fas-induced (FICD) cell death were induced in vitro using anti-CD3 and anti-Fas antibodies respectively.

**Results:** ELISA evaluation of TIMP-1 in sera from 32 ALPS patients (11 ALPS and 21 DALD) and 50 healthy controls detected higher levels in both patients groups ( $p < 0.0001$ ), unassociated with variations of the TIMP-1 gene. Since both patients' groups displayed increased levels of OPN, we investigated whether OPN influences TIMP-1 expression in vitro. Results showed that OPN increased TIMP-1 secretion by monocytes in a time- and dose-dependent manner. Moreover, TIMP-1 significantly inhibited both FICD and AICD of lymphocytes.

**Conclusion** These data suggest that the high OPN levels may support high TIMP-1 levels in ALPS and DALD, and hence worsen the apoptotic defect in these diseases.

### **Key Messages**

ALPS and DALD patients display high serum levels of TIMP-1, which might be induced by high OPN levels acting on monocytes.

The high TIMP-1 levels may contribute to development of autoimmunity-lymphoproliferation by inhibiting lymphocyte apoptosis.

### **Capsule Summary**

Levels of TIMP-1 and Osteopontin, which can inhibit lymphocyte apoptosis, are increased in ALPS patients' serum. Therefore, they may worsen the apoptotic defect causing ALPS and might be targets of therapies counteracting the defect.

### **Key words**

Osteopontin, Tissue Inhibitor of metalloproteinases 1, lymphoproliferation, apoptosis, autoimmunity.

### **Abbreviations used**

AICD: Activation-induced cell death

ALPS: Autoimmune lymphoproliferative syndrome

DALD: Diansani autoimmune lymphoproliferative disease

DN: Double Negative

FICD: Fas-induced cell death

FITC : Fluorescein isothiocyanate

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

IL: Interleukin

IQR: interquartile range

LDH: Lactate Dehydrogenase

MMP: Matrix Metalloproteinases

OPN: Osteopontin

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells

PE: Phycoerythrin

PHA: Phytohemagglutinin

rOPN: Recombinant Osteopontin

rTIMP-1: Recombinant Tissue Inhibitor of metalloproteinases

TCR: T-cells receptor

TIMP-1: Tissue Inhibitor of metalloproteinases

## INTRODUCTION

The autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) is an inherited disease characterized by polyclonal accumulation of lymphocytes in the spleen and lymph nodes with lymphadenomegaly and/or splenomegaly and development of autoimmune manifestations that predominantly involve blood cells.<sup>1</sup> Typically, ALPS patients display expansion of TCR $\alpha\beta$  positive, CD4/CD8 double-negative (DN) T cells in the peripheral blood and lymphoid tissues, and defective function of the Fas death receptor, involved in switching off the immune response.<sup>2</sup> Fas is highly expressed on activated lymphocytes and its ligation by Fas ligand (FasL) triggers their apoptotic death through activation of a caspase cascade.<sup>3</sup> Moreover, ALPS patients are predisposed to develop lymphomas in adulthood. Most ALPS cases are ascribed to deleterious mutations of the Fas gene (ALPS type Ia), though a few patients carry mutations of the FasL gene (ALPS type Ib) or the caspase 10 gene (ALPS type II). However, a substantial proportion of ALPS patients displays defective Fas-induced cell death (FICD) but the mutated gene is not known (ALPS type III).<sup>4,5</sup>

We described a picture that fulfils the first three criteria, but lacks expansion of DN T cells and mutations of the Fas, FasL or caspase-10 genes.<sup>6,7</sup> Since the complete paradigm of ALPS could not be demonstrated, this disease has been provisionally named Dianzani Autoimmune Lymphoproliferative Disease (DALD) by McKusick (OMIM reference #605233; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>).<sup>6</sup> A further point is that an ALPS-like disease may even be caused by apoptotic defects unrelated to Fas function since Olivera et al<sup>8</sup> have described a patient carrying a mutation in the n-Ras gene, who displayed normal FICD, but defective non receptor-mediated mitochondrial apoptosis. They suggest that this form should be classified as ALPS type IV.

In addition to causal mutations, ALPS development may be influenced by the genetic background. This may explain the incomplete penetrance of mild mutations. It has been shown for the mouse model of ALPS, i.e. *MRL<sup>lpr/lpr</sup>* and *MRL<sup>gld/gld</sup>* mice carrying mutations of the Fas and FasL genes respectively, since these mutations cause a much milder clinical picture in

strains other than MRL one.<sup>9</sup> In humans, a role may be played by variations of the OPN gene since some of them result in an 8 fold increase in the risk of developing DALD, possibly through mRNA stabilisation.<sup>10</sup> OPN is a phosphorylated glycoprotein containing an arginine-glycine-aspartate motif and displays both adhesive and cytokine functions. It is secreted by activated macrophages and activated T cells, and is present in extracellular fluids, at sites of inflammation, and in the extracellular matrix of mineralized tissues.<sup>11</sup> It interacts with a variety of cell surface receptors, including several integrins and CD44. Binding of OPN to these cell surface receptors stimulates cell adhesion/migration and triggers several signaling pathways.<sup>12</sup> OPN *in vivo* mainly acts as a pro-inflammatory cytokine by chemoattracting monocytes/macrophages and stimulating T helper 1 differentiation.<sup>13</sup> DALD patients and MRL*lpr/lpr* mice display increased serum levels of OPN, that may favour disease development by inhibiting activation-induced cell death (AICD)<sup>10</sup>, which is a further mechanism to switch off the immune response. AICD is induced by lymphocyte reactivation through the antigen receptor, it is partly independent from Fas function, and may functionally compensate the Fas-function defect in ALPS patients.<sup>14</sup>

Our attention to OPN has been prompted by a cDNA array analysis comparing expression of genes involved in lymphocyte apoptosis and proliferation in a DALD patient and her healthy brother. Apart from OPN, we detected a second transcript clearly hyperexpressed in the patient, namely that of TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1), which belongs to a family of proteins functioning as specific inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs).<sup>15</sup> This observation was intriguing, since TIMP-1 also acts as an autocrine and paracrine factor that influences several functions of immune cells, including apoptosis. For example, it inhibits AICD in Hodgkin lymphoma cells and upregulates the anti-apoptotic protein BclX<sub>L</sub> in Burkitt lymphoma cells. Moreover, human recombinant TIMP-1 (rTIMP-1) inhibits the cell-mediated cytotoxicity that may play a role in lymphocyte AICD.<sup>16-18</sup> These observations prompted the present investigation of the role of TIMP-1 in ALPS and DALD development. We found that TIMP-1 serum levels were higher in both ALPS and DALD patients than in healthy controls, but sequencing of the TIMP-1 gene showed that this was not ascribable to its variations. By



contrast, we found that recombinant OPN (rOPN) stimulated TIMP-1 expression by monocytes in vitro. Since we also showed that TIMP-1 inhibits both FICD and AICD of lymphocytes in vitro, these data suggest that it is involved in ALPS and DALD development by worsening the apoptotic defect.

## **METHODS**

### **Patients**

We analyzed 11 ALPS and 21 DALD patients followed at the Pediatric Department, University of Turin, Italy and 50 age-matched healthy controls. ALPS was diagnosed from the presence of all the following criteria: 1) autoimmune manifestations; 2) chronic non-malignant lymphadenopathy (two or more enlarged lymph nodes over 2 cm in diameter) and/or splenomegaly; 3) defective Fas-induced apoptosis in vitro, 4) mutations in the Fas, FasL, or caspase-10 genes and/or expansion of DN T cells in the peripheral blood. The Fas, FasL, caspase-10, and OPN genes were sequenced from genomic DNA, as previously reported by Chiocchetti et al<sup>10</sup>. DALD was diagnosed from the presence of the first three criteria only.

Common infectious causing lymphadenopathy (Epstein Barr Virus, Cytomegalovirus, Rubella and/or Toxoplasma) were ruled out by serological testing; histology of the lymph nodes was evaluated in patients with bulky adenopathies indicative of malignancy. Patients were screened for serum autoantibodies (anti-phospholipid, anti-nuclear, anti-native-DNA, anti-mitochondrion and anti-smooth-muscle antibodies); anti-blood-cell autoantibodies were sought if peripheral cytopenia was present. Serum immunoglobulin (Ig) levels were determined and lymphocyte immunophenotype was investigated. DN T cell levels were determined by immunofluorescence and flow cytometry, and used to differentiate ALPS and DALD; DN T cell expansion was defined as DN T cells >2% of total TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> circulating lymphocytes. Written informed consent was obtained from patients and controls. The study was planned according to the guidelines of the local ethical committee.

### **Cells**

PBMC were separated by the Ficoll-Hypaque (Lympholyte-H, Cedarlane Laboratories, Netherlands) density-gradient centrifugation. Cultures were performed in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, and penicillin-streptomycin (Invitrogen, Burlington, ON, Canada).

CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells, and monocytes were negatively purified from PBMC using magnetic bead kits (Miltenyi-Biotec GmbH, Germany). CD19<sup>+</sup> B cells were purified from tonsils of children undergoing routine tonsillectomies and further fractionated by discontinuous Percoll (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) density gradients as previously described by Dono et al<sup>19</sup>. Cell purity was checked by immunophenotypic analyses and was higher than 95%.

Spontaneous cell death was evaluated by the Trypan blue exclusion test and assessment of lactate dehydrogenase (LDH) release in the culture supernatants with the CytoTox-One™ Homogeneous Membrane Integrity Kit (Promega, Madison, USA).

### **Array analysis**

Panorama Human Cytokine Gene Arrays (PRCK0002) and Panorama Human Apoptosis Array (PRAP0002) were purchased from Sigma-Genosys (London, United Kingdom) as previously described by Chiocchetti et al<sup>10</sup>.

### **ELISA**

Concentrations of OPN and TIMP-1 were measured in sera and culture supernatants by ELISA according to the manufacturers (R&D system, Minneapolis, USA; and IBL, Germany respectively). Absorbance was detected with a microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA) and the I-smart program was used to calculate the *standard* curve.

### **Real-Time RT-PCR**

Total RNA was isolated from PBMC cultures, treated or not with rOPN, using the Nucleospin RNAII kit (Machery-Nagel, Germany). RNA (500ng) was retrotranscribed by the ThermoScript™ RT PCR System (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). TIMP-1 expression was evaluated with a gene expression assay (Assay-on Demand: TIMP-1, Assay No. Hs99999139\_m; Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). The Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH Assay No. Hs99999905\_m1) was used to normalize for cDNA amounts. Real time

PCR was performed using the 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem) in duplicate for each samples, in a 20  $\mu$ L final volume containing 0.5  $\mu$ L diluted cDNA, 10  $\mu$ L TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystem), and 1  $\mu$ L Assay-on Demand mix. The thermocycler parameters were 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60°C for 1 min. The results were analyzed with a *standard* curve model.

### **Intracellular staining of TIMP-1**

Intracellular staining of TIMP-1 was performed on cells permeabilized using the FIX&PERM kit (Caltag, Burlingame, CA). Monocytes were treated with or without 1  $\mu$ g/ml rOPN for 6h, in the presence of 10  $\mu$ g/ml Brefeldin A (Sigma Aldrich St. Louis MO) and then stained with a FITC-conjugated anti-CD14 antibody (Caltag), fixed, permeabilized, and stained with a PE-conjugated anti-TIMP-1 antibody (R&D system) prior to analysis with a FACSCalibur cytofluorimeter (BD Biosciences).

### **Cell death assays**

AICD and FICD were evaluated, as previously reported by Chiocchetti et al<sup>10</sup>, on T cell lines obtained by activating PBMC with PHA at days 0 (1  $\mu$ g/ml) and 12 (0.1  $\mu$ g/ml) and cultured in RPMI 1640 medium+10% FBS + IL-2 (2 U/ml) (Biogen). AICD was assessed at day 6, FICD at day 18. In the AICD assay, cells were cultured in wells coated with anti-CD3 mAb (OKT3, 10  $\mu$ g/ml), whereas in the FICD assay they were cultured in the presence of a soluble anti-Fas mAb (CH11, UPSTATE 1 $\mu$ g/ml). In these assays, cells ( $5 \times 10^4$ /well) were cultured with RPMI + 5% FBS + 1U/ml IL-2 in the presence or absence of titrated amounts (0.25, 0.5 and 1 $\mu$ g/ml) of rTIMP-1 (R&D system) for 16 hours. AICD was performed also in the presence of alkylated-rTIMP-1 (1 $\mu$ g/ml), while FICD also in the presence of a neutralizing-TIMP-1-antibody (3 $\mu$ g/ml). Live cells were then counted in each well using the trypan blue exclusion test. Assays were performed in triplicate and results were expressed as relative cell survival % calculated as

follows: (total live cell count in the assay well / total live cell count in the respective control well) X 100.

### **Statistical analysis**

The Mann-Whitney U-test was used to compare unpaired data of different groups and Wilcoxon's signed rank test for analysis of paired data in a group. TIMP-1 and OPN values were expressed as median and 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentile (interquartile range, IQR). Correlations were tested by Pearson analysis. All p values were 2-tailed and the significance cut-off was  $p < 0.05$ . Statistical analysis was performed with the GraphPad InStat software (GraphPad Software, San Diego, California, USA) software.

## RESULTS

### **TIMP-1 expression is increased in ALPS and DALD patients**

The transcriptome of PHA-activated PBMC derived from a DALD patient and her healthy brother was evaluated by cDNA macroarrays containing 573 genes involved in cell apoptosis or proliferation. Analysis showed altered expression of several genes in the patient. The most striking differences were increased expression of OPN, previously reported,<sup>10</sup> and TIMP-1 (see **Figure 1A**). To confirm increased expression of the TIMP-1 mRNA, we assessed its level by real time PCR, and found that PHA-activated PBMC from the patient displayed 1.6 higher levels than those from the brother (see **Figure 1B**).

To move this observation to the protein level and assess its generality, we measured TIMP-1 in the sera of 11 ALPS and 21 DALD patients and 50 healthy age-matched controls by ELISA. Results showed that TIMP-1 levels were about 1.5 fold higher in ALPS/DALD patients (median=131 ng/ml; IQR 119-164 ng/ml) than in the controls (median=83 ng/ml; IQR 56-110 ng/ml) ( $p<0.0001$ ) (see **Figure 2**); levels were similar in the two patient groups (ALPS median=132 ng/ml, IQR 117-171 ng/ml; DALD median=131ng/ml, IQR 122-141ng/ml,  $p<0.0001$  both groups).

To determine whether this increase was associated with variants of the TIMP-1 gene, we sequenced its exons and intron boundaries in all patients and controls. Results detected 5 single nucleotide polymorphisms reported in Table I, but their allelic and genotypic frequencies were not different in patients and controls, and not associated to TIMP-1 levels (data not shown).

### **OPN induces TIMP-1 expression in vitro**

Since both groups of patients displayed increased serum levels of OPN (median: ALPS 230 ng/ml, DALD 250ng/ml vs controls 142 ng/ml;  $p<0.05$  and  $p<0.001$  respectively), we investigated the functional interplay between OPN and TIMP-1 which are both involved in the inflammatory response.

To this aim, we evaluated the effect of rOPN on TIMP-1 expression in vitro. PBMC from healthy controls were cultured in the presence and absence of rOPN and TIMP-1 expression was evaluated at different times both at the mRNA and protein level. Real-time PCR evaluation of the TIMP-1 mRNA showed that rOPN induced TIMP-1 upregulation that peaked after 6h, and then decreased during the following 16h and 24h (see **Figure 3A**). ELISA evaluation of protein secretion showed that untreated PBMC displayed substantial secretion of TIMP-1 after 24h of culture that declined at 72h, whereas rOPN increased TIMP-1 secretion by about 50% during the first 24h ( $p < 0.05$ ) and levels did not decline during the 72h culture ( $p < 0.01$ ) (see **Figure 3B**). The OPN effect on TIMP-1 secretion was not ascribable to its capacity to protect cells from apoptosis Guedez et al<sup>18</sup> since live cell counts were not different in OPN-treated and -untreated wells at any culture time (12-24-48-72h). Moreover, proportions of CD14<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> cells, detected by immunofluorescence and flow cytometry, did not detect differences in OPN-treated and -untreated wells at any culture time (data not shown). Further experiments evaluated the effect of titrated amounts of rOPN on TIMP-1 secretion by PBMC after 48h of culture and showed that the effect was dose-dependent; the 5 $\mu$ g/ml dose of rOPN increased TIMP-1 secretion by about 2 fold (see **Figure 3C**).

To detect which cell type was secreting TIMP-1 in our assay, we evaluated its secretion by purified CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells, CD19<sup>+</sup> B cells, and CD14<sup>+</sup> monocytes ( $0.5 \times 10^6$ /ml each) cultured in the presence and absence of rOPN (1  $\mu$ g/ml). ELISA evaluation of TIMP-1 in the supernatants collected after 48h showed that both the basal and the OPN-induced secretion of TIMP-1 were mainly detectable in monocytes, whereas the other cell types secreted minimal amounts (see **Figure 4A**). The specificity of the rOPN effect was assessed in parallel experiments in which monocytes were treated with rOPN (1  $\mu$ g/ml) in the presence of an anti-OPN neutralizing mAb (10  $\mu$ g/ml). Results showed that OPN neutralization abrogated the TIMP-1 secretion induced by rOPN (see **Figure 4A**).

To confirm the effect of rOPN on TIMP-1 production by monocytes, we analyzed TIMP-1 expression at the single-cell level by intracytoplasmic immunofluorescence. Purified monocytes cultured with or without rOPN (1  $\mu$ g/ml) for 6h were surface-stained with a FITC-conjugated

anti-CD14 mAb, permeabilized, and then intracellular-stained with a PE-conjugated anti-TIMP-1 mAb. Intracellular staining confirmed that monocytes basally produced TIMP-1, and that it was substantially upregulated by rOPN (see **Figure 4B**). This effect was not ascribable to OPN-mediated modulation of cell death in culture, since similar cell death levels were detected in OPN-treated and -untreated cells by assessment of LDH release and by the Trypan blue exclusion test (data not shown).

### **TIMP-1 inhibits T cell apoptosis**

Since ALPS and DALD are ascribed to defective lymphocyte apoptosis and we had already found that OPN may contribute to the defect by inhibiting AICD<sup>10</sup>, we investigated the role of TIMP-1 in AICD or FICD in PHA-derived T cell lines obtained from healthy controls. In the presence of rTIMP-1 (1 µg/ml), cells were treated with anti-CD3 or anti-Fas mAb to induce AICD and FICD respectively and cell survival was evaluated after 16h. Results showed that rTIMP significantly inhibited both FICD ( $p < 0.05$ ) and, at higher levels, AICD ( $p < 0.001$ ) (see **Figure 5**). Titration experiments showed that the effect was dose-dependent in the 0.25-1 µg/ml range (data not shown). To assess its specificity, we evaluated the effect of rTIMP-1 (1 µg/ml) on AICD and FICD in the presence and absence of an anti-TIMP-1 neutralizing antibody (3 µg/ml). Results showed that the anti-TIMP-1 antibody abrogated the rTIMP-1 effect on both AICD and FICD, supporting its specificity. To assess relationship with the MMP inhibitory activity of TIMP-1, we compared the effect of rTIMP-1 and its alkylated form, which loses the MMP-inhibitory activity, on AICD. Results showed that rTIMP alkylation abrogated the rTIMP-1 effect on AICD, suggesting that this effect was not dependent on MMP activity.



## DISCUSSION

This work shows that TIMP-1 levels are increased in ALPS and DALD patients, and suggests that they worsen the lymphocyte apoptotic defect causing these diseases. This possibility is supported by our in vitro data showing that TIMP-1 inhibit both FICD and AICD of activated T cells, just as other workers have shown that it inhibits B cell apoptosis induced by both Fas-dependent and -independent pathways, and apoptosis of several other cell types.<sup>10</sup> The TIMP-1 concentrations inhibiting apoptosis in our in vitro experiments are slightly higher than those detected in the patient sera, but it is conceivable that microenvironmental concentrations of TIMP-1 in secondary lymphoid tissues are higher than those detected in sera.

The effect of TIMP-1 on lymphocyte apoptosis was not dependent on its inhibition of MMPs, since it was preserved in alkylated TIMP-1 which is known to lose the MMP-inhibitory activity. This indicates that the effect might be mediated by TIMP-1 interaction with its receptor CD63, a tetraspanin that is often used as a marker of late endosomes, but is also expressed on the surface of several cell types including activated T cells. In line with this possibility, CD63 has been shown to deliver costimulatory signals to T cells<sup>20</sup> and exert an anti-apoptotic effect in other cell types.<sup>21</sup>

These data suggest that TIMP-1 may flank two other factors, previously suggested as contributors to ALPS and DALD, by worsening the lymphocyte apoptosis defect due to inherited alterations of the Fas pathway, i.e. OPN and perforin.<sup>10,22</sup>

ALPS and DALD patients display increased OPN levels that may favour development of ALPS by inhibiting AICD, which triggers apoptosis of activated lymphocytes in a partly Fas-independent manner. This anti-apoptotic effect was probably independent from that induced by TIMP-1 since it was not effective on FICD and it was detected in cultured T cell lines which do not secrete TIMP-1 in response to OPN.

Perforin is a protein contained in the cytolytic granules of cytotoxic cells and plays a key role in induction of the apoptosis of target cells. On the one hand, severe biallelic mutations of the perforin gene impairing cell-mediated cytotoxicity and viral clearance, cause familial hemophagocytic lymphohistiocytosis, a severe inherited immunodeficiency with some aspects

of lymphoproliferation.<sup>22-25</sup> On the other hand, we have suggested that its mild variations favour development of ALPS and DALD, possibly because cell-mediated cytotoxicity is involved in switching off the immune response by killing activated immune cells. In line with this possibility, others have shown that perforin-mediated AICD may partly compensate the apoptosis defect in ALPS.<sup>13</sup> In this light, it is intriguing that rTIMP-1 inhibits cell-mediated cytotoxicity induced in alloreactive mixed lymphocyte cultures.<sup>26</sup> Moreover, the TIMP-1 receptor CD63 marks the cytolytic granules of cytotoxic cells and its surface expression is increased in active cytotoxic cells. These observations suggest that high levels of TIMP-1 may also affect this compensatory mechanism in ALPS patients.

Some of us have previously shown that the +372C variant of the TIMP-1 gene is associated to Italian male patients affected by Systemic Sclerosis, while no differences were observed in the female group.<sup>27</sup> We found the same allele distribution in both patients and controls, and no gender-associated variation was found. Moreover, by contrast with OPN, whose high levels are partly ascribable to allelic variants of its gene, we found no variation associated with high TIMP-1 levels.

The increased TIMP-1 production of ALPS patients may thus be secondary to other stimuli. IL-6, IL-1 $\beta$ , b-FGF, EGF, and PDGF<sup>28</sup> induce TIMP-1 secretion, but their involvement in our patients is unlikely since only a few of them displayed increased levels of these cytokines (data not shown). By contrast, an effective stimulus might be OPN since its levels are significantly increased in the patients. In line with this possibility, our in vitro experiments showed that OPN substantially induced TIMP-1 secretion in monocytes at concentrations comparable to those detectable in vivo.

In addition to its effect on lymphocyte apoptosis, TIMP-1 may theoretically exert other effects in ALPS development. For instance, ALPS patients often display hypergammaglobulinemia and other authors have reported increased IL-10 levels.<sup>29</sup> Both of these features may be influenced by TIMP-1, since it has been shown to regulate B cell differentiation and induce expression of IL-10<sup>16,30</sup> moreover, TIMP-1 serum levels have been correlated with hypergammaglobulinaemia

in patients with eosinophilic fasciitis.<sup>31</sup> However, we did not detect any significant correlation between TIMP-1 and IL-10 levels or hypergammaglobulinemia in our patients (data not shown).

### **Conclusions**

In conclusion, these data suggest that the high OPN serum levels of ALPS patients may worsen the apoptotic defect causing ALPS by direct inhibition of AICD and/or induction of high TIMP-1 levels inhibiting both AICD and FICD. This may open the way to novel approaches to ALPS/DALD therapy aimed at inhibiting the effects of these concurring factors.

**Acknowledgments:** AC and UD drafted the manuscript, all authors contributed to the revision. EB, MI, SN, EO, SB and RM performed the experiments. MFC and UR diagnosed and characterized patients. EB, MI and AC performed statistical analyses. UR, MCM and UD critically revised the paper. All authors edited and approved the written manuscript. The authors declare no competing financial interests.

## REFERENCES

1. Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med.* 1999;130:591-601.
2. Bleesing JJ, Brown MR, Straus SE, Dale JK, Siegel RM, Johnson M, et al. TcR-alpha/beta(+) CD4(-)CD8(-) T cells in humans with the autoimmune lymphoproliferative syndrome express a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and represents a marker of altered O-glycan biosynthesis. *Clin Immunol.* 2001; 100:314-324.
3. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997;88:355-365.
4. Campagnoli MF, Garbarini L, Quadrello P, Garelli E, Carando A, Baravalle V, et al. The broad spectrum of autoimmune lymphoproliferative disease: molecular bases, clinical features and long-term follow-up in 31 patients. *Haematologica.* 2006;1:538-541.
5. Martin DA, Zheng L, Siegel RM, Huang B, Fisher GH, Wang J, et al. Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:4552-4557.
6. Dianzani U, Bragardo M, DiFranco D, Alliaudi C, Scagni P, Buonfiglio D, et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood,*1997;89:2871-2879.
7. Ramenghi U, Bonisconi S, Migliaretti G, DeFranco S, Bottarel F, Gambaruto C, et al. Deficient of apoptosis pathway without fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. *Blood,* 2000;95:3176-13182.
8. Oliveira JB, Bidere N, Niemela JE, Zheng L, Sakai K, Nix CP, et al. NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:8953–8958.
9. Rieaux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science.* 1995;268:1347-1349.
10. Chiocchetti A, Indelicato M, Bensi T, Mesturini R, Giordano M, Sametti S, et al. High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/ lymphoproliferation. *Blood,* 2004;103-1376-1382.
11. 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.
12. 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.

13. Hashimoto M, Sun D, Rittling SR, Denhardt DT, Young W. Osteopontin-deficient mice exhibit less inflammation, greater tissue damage, and impaired locomotor recovery from spinal cord injury compared with wild-type controls. *J Neurosci*. 2007;27:3603-3611.
14. Mateo V, Ménager M, de Saint-Basile G, Stolzenberg MC, Roquelaure B, André N. Perforin-dependent apoptosis functionally compensates Fas deficiency in activation-induced cell death of human T lymphocytes. *Blood*. 2007; 110:4285-92.
15. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003; 92:827-839.
16. Guedez L, Martinez A, Zhao S, Vivero A, Pittaluga S, Stetler-Stevenson M, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) promotes plasmablastic differentiation of a Burkitt lymphoma cell line: implications in the pathogenesis of plasmacytic/plasmablastic tumors. *Blood*. 2005;105:1660-1668.
17. Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, Wang J, Fukushima P, Mansoor A, et al. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest*. 1998;102:2002-2010.
18. Guedez L, Courtemanch L, Stetler-Stevenson M. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood*. 1998;92:1342-1349.
19. Dono M, Zupo S, Augliera A, Bugio VL, Massara R, Melagrana A, et al. Subepithelial B cells in the human palatine tonsil. II. Functional characterization. *Eur J Immunol*. 1996;26:2043-2049.
20. Pfistershammer K, Majdic O, Stöckl J, Zlabinger G, Kirchberger S, Steinberger P, et al. CD63 as an activation-linked T cell costimulatory element. *J Immunol*. 2004;173:6000-6008.
21. Jung KK, Liu XW, Chirco R, Fridman R, Kim HR. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J*. 2006;25:3934-3942
22. Clementi R, Chiocchetti A, Cappellano G, Cerutti E, Ferretti M, Orilieri E, et al. Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function. *Blood*. 2006;108:3079-84.
23. Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, Bhawan S, Certain S, Mathew PA, et al. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science*. 1999;286:957-959.
24. Feldmann J, Le Deist F, Ouachee-Chardin M, Certain S, Alexander S, Quartier P, et al. Functional consequences of perforin gene mutations in 22 patients with familial haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol*. 2002;117:965-972.
25. Fadeel B, Orrenius S, Henter JI. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: too little cell death can seriously damage your health. *Leuk Lymphoma*. 2001;42:13-20.

26. Oelmann E, Herbst H, Zuhlsdorf M, Alberecht O, Nolte A, Schmitmann C, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinase 1 is an autocrine and paracrine survival factor, with additional immune-regulatory functions, expressed by Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood*. 2002;99:258-267.
27. Indelicato M, Chiarenza V, Libra M, Malaponte G, Bevelacqua V, Marchini M, et al. Analysis of TIMP-1 gene polymorphisms in Italian sclerodermic patients. *J Clin Lab Anal*. 2006;20:173-76.
28. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;49:187-198.
29. Lopatin U, Yao X, Williams RK, Bleesing JJ, Dale J, Wong D, et al. Increases in circulating and lymphoid tissue interleukin-10 in autoimmune lymphoproliferative syndrome are associated with disease expression. *Blood*. 2001;97:3161-3170.
30. GuedeZL, Mansoor A, Birkedal-Hansen B, Lim MS, Fukushima P, Venzon D, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 regulation of interleukin-10 in B-cells differentiation and lymphomagenesis. *Blood*. 2001;97:1796-802.
31. Jinnin M, Ihn H, Yamane K, Asano Y, Yazawa N, Tamaki K. Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and 2 in patients with eosinophilic fasciitis. *Br J Dermatol*. 2004;151:407-412.

## Figure Legends

### **Figure 1. TIMP-1 is hyper-expressed in PHA-activated lymphocytes from a DALD patient.**

**A**, Macroarray membranes hybridized with cDNA from a DALD patient and her healthy brother. Black arrows: OPN, white arrows: TIMP-1. **B**, mRNA levels of TIMP-1 in lymphocytes evaluated by real-time PCR. GAPDH was used to normalize cDNA amounts. Results are expressed as fold-increase relative to the brother's levels.

### **Figure 2. ALPS and DALD patients display increased TIMP-1 serum levels.**

Serum concentrations of TIMP-1 (ng/ml) in 11 ALPS and 21 DALD patients, and 50 healthy controls. ALPS (black circles); DALD (black triangles); controls (white diamonds). The horizontal bars indicate the median values for each group and boxes represent IQR. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U-test.

### **Figure 3. rOPN induces TIMP-1 expression in vitro. A-B**

TIMP-1 expression in PBMC cultured with/without rOPN (1µg/ml) for different times. **A**, TIMP-1 mRNA evaluated in cell lysates by real-time PCR; **B**, TIMP-1 protein evaluated in the culture supernatants by ELISA. **C**, TIMP-1 protein secreted after 48h treatment with titrated rOPN. Means±SE from 6 experiments; \*p<0.05, \*\*p<0.01 (Wilcoxon's signed rank test).

### **Figure 4. Monocytes are the main cell type secreting TIMP-1 in response to rOPN. A,**

ELISA evaluation of TIMP-1 secreted by CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells, CD19<sup>+</sup> B cells, CD14<sup>+</sup> monocytes after 48h culture with/without rOPN and anti-OPN antibodies. Means±SE from XX experiments \*: p<0.05 (Mann-Whitney U test). **B**, Intracellular TIMP-1 staining of CD14<sup>+</sup> monocytes cultured for 6h with/without rOPN.

### **Figure 5. rTIMP-1 inhibits AICD and FICD of T cells. AICD (A) and FICD (B) were**

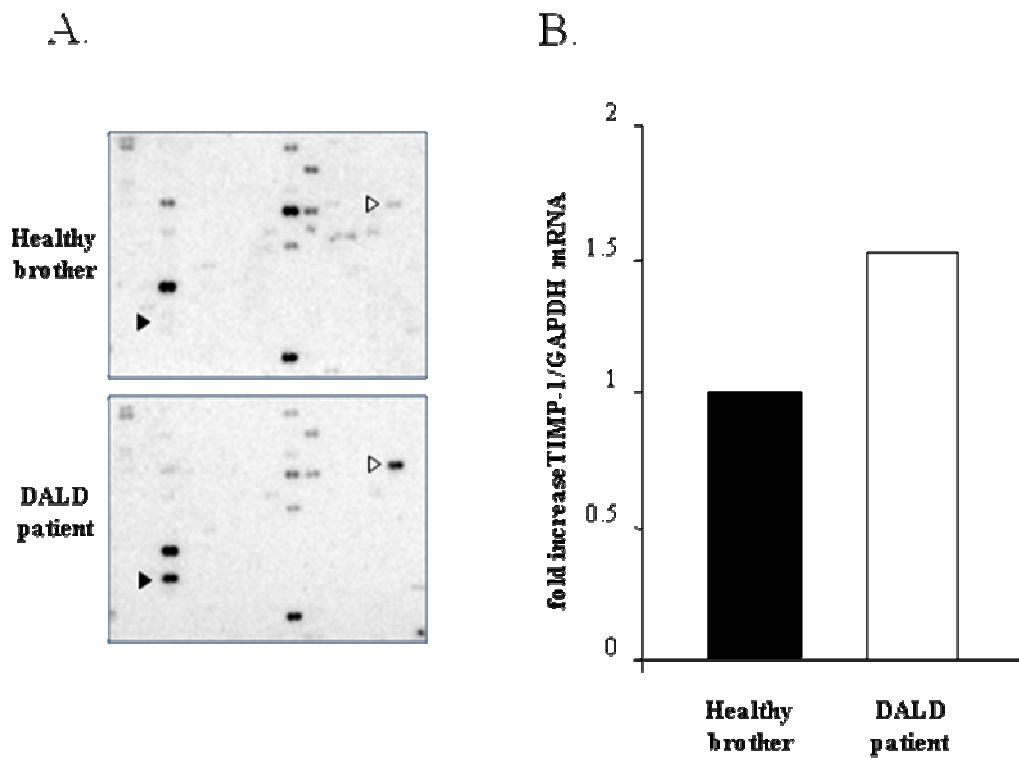
induced in PHA-derived T cell lines from healthy controls in the presence/absence of rTIMP-1, alkylated rTIMP-1, and anti-TIMP-1 antibodies. Results are expressed as relative cell survival % and are the mean±SE of 5 experiments. \*: p<0.05; \*\*: p<0.01 (Mann-Whitney U-test).

**Table I. SNPs in the TIMP-1 gene found in the Italian population**

	SNP*	position	ref#
1	IVS4+478 G>C	intron 4	rs 5953060
2	+372 T>C	exon 5	rs 4898
3	IVS5+673 A>G	intron 5	rs 6609533
4	+1053 G>T	3'UTR	rs 2070584
5	+1187 G>A	3'UTR	rs 6609534

\* numeration is referred to ATG = +1

# <http://snpper.chip.org>



**Figure 1**



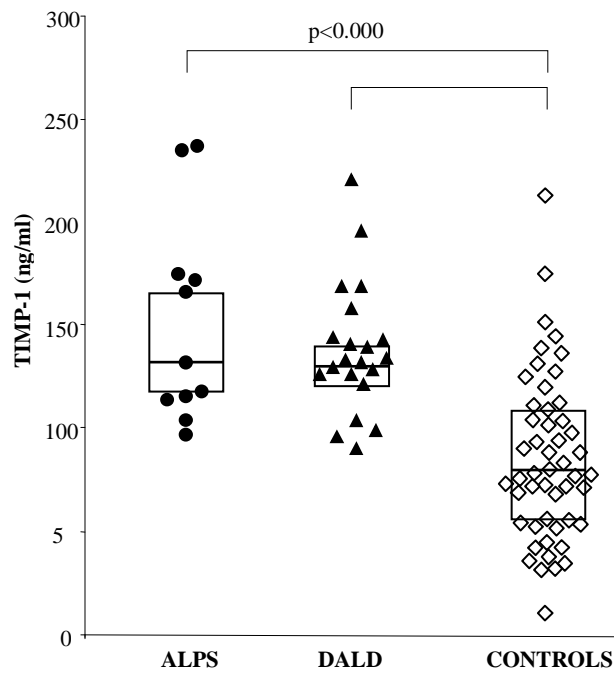


Figure 2

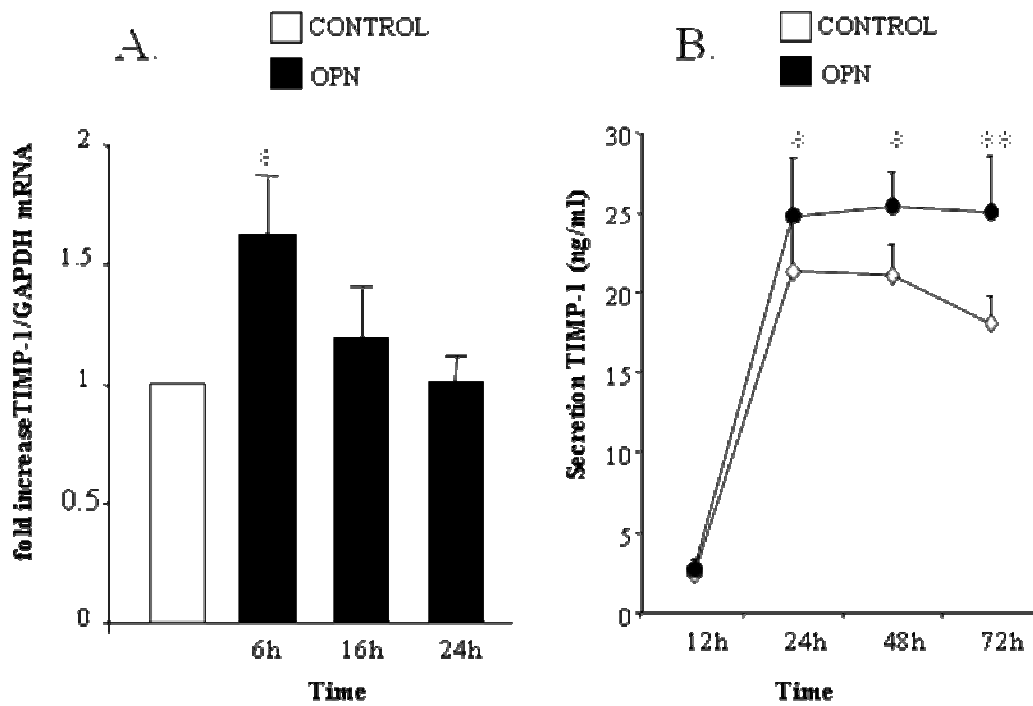


Figure 3

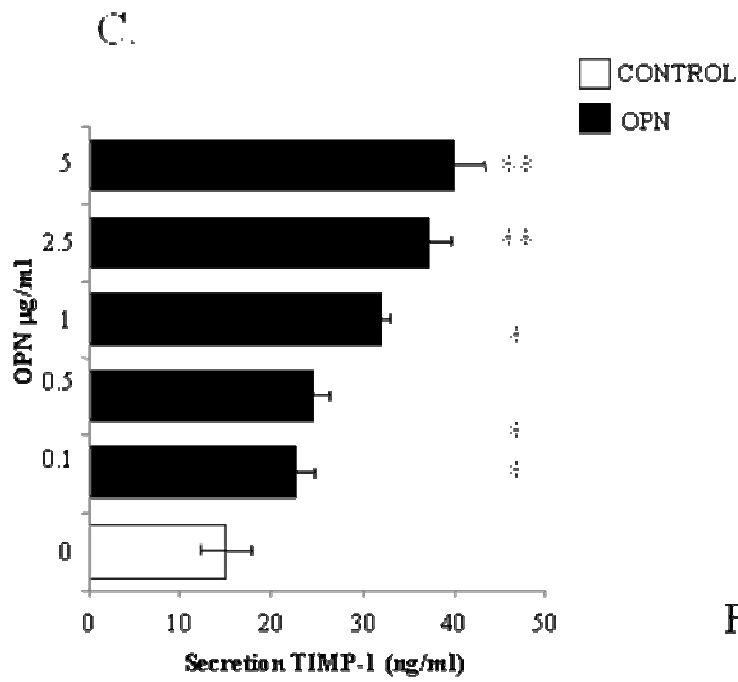


Figure 3

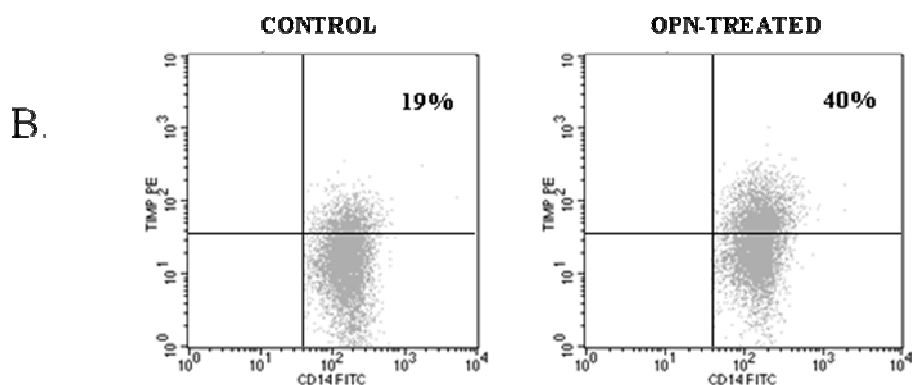
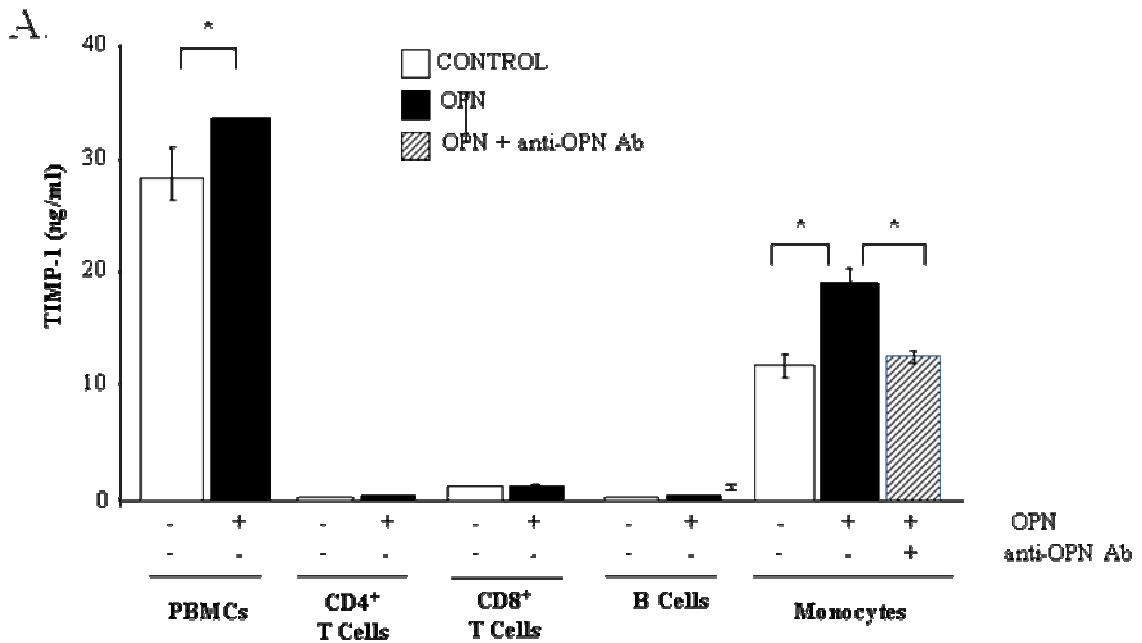


Figure 4

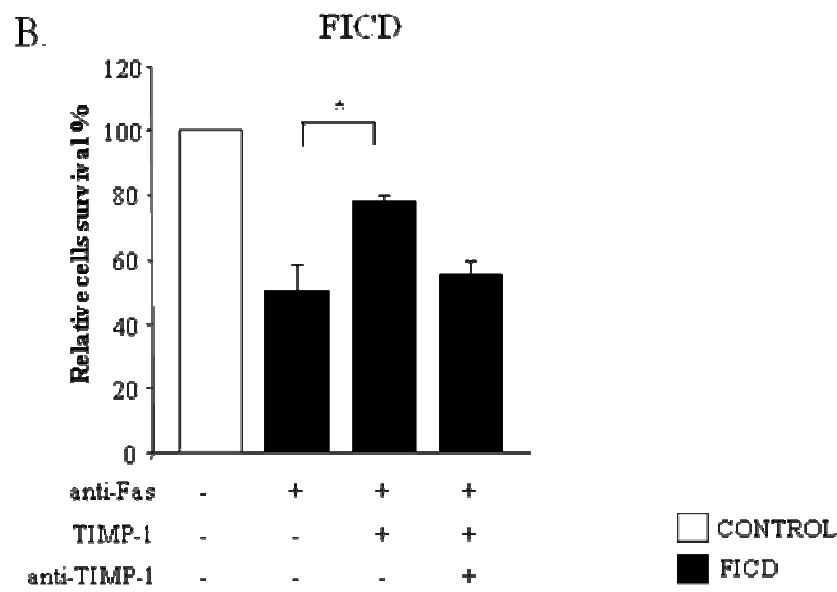
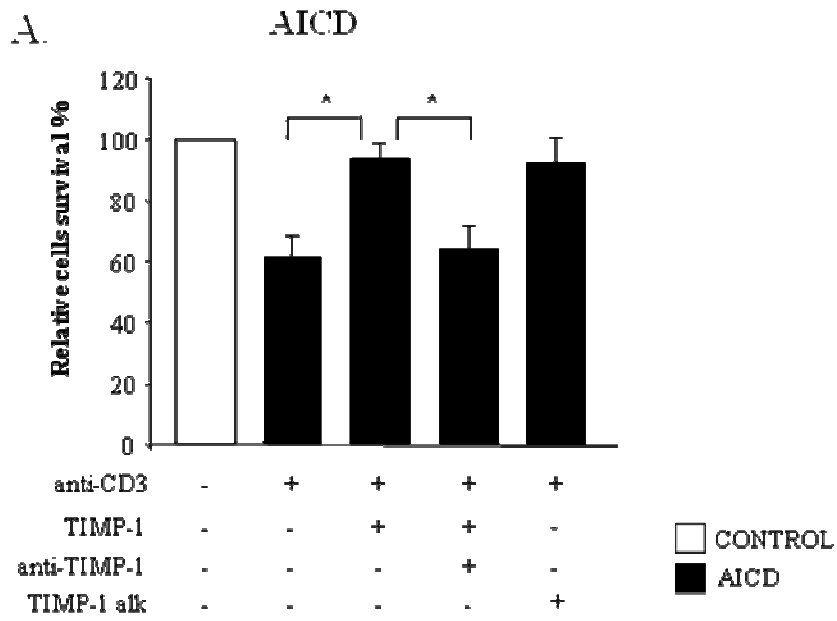


Figure 5