

Università degli Studi del Piemonte Orientale

“Amedeo Avogadro”

Dipartimento di Scienze della Salute



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare

Ciclo XXV (2009-2012)

**RUOLO DI OSTEOPONTINA E
DI ANTICORPI ANTI-OSTEOPONTINA
NELLA SCLEROSI MULTIPLA**

Candidato: Angela Maria Felicia Soluri

Relatore : Prof. Umberto Dianzani

INDICE

1. PREMESSA	pag. 4
2. RIASSUNTO	pag. 8
3. INTRODUZIONE	pag. 12
3.1 <i>Aspetti generali dell'autoimmunità</i>	pag. 12
3.2 La Sclerosi Multipla (SM)	pag. 15
3.2.1 Epidemiologia	pag. 15
3.2.2 Fattori immunologici	pag. 16
3.2.3 Patogenesi	pag. 18
3.3 Osteopontina (OPN)	pag. 19
3.3.1 Caratteristiche strutturali e funzionali	pag. 19
3.3.2 Ruolo nell'infiammazione	pag. 20
3.3.3 Ruolo nei tumori	pag. 21
3.3.4 Ruolo nelle malattie autoimmuni	pag. 21
3.3.5 Ruolo nella Sclerosi Multipla	pag. 22
3.4 I vaccini nelle malattie autoimmuni	pag. 25
4. SCOPO DELLA TESI	pag. 27
5. MATERIALI E METODI	pag. 28
5.1 Clonaggio delle proteine ricombinanti	pag. 28
5.2 Prova di tossicità	pag. 30
5.3 Trasfezione di cellule CHO-s produzione di cloni stabili	pag. 30
5.4 Western Blotting	pag. 31
5.5 Coltura di cellule CHO-s ad alta densità	pag. 31
5.6 Purificazione proteica	pag. 31

5.7	Digestione enzimatica con trombina	pag. 32
5.8	Saggio ELISA	pag. 32
5.9	Separazione su gradiente di cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC)	pag. 32
5.10	Separazione di linfociti T CD4 ⁺ e monociti da PBMC	pag. 33
5.11	Saggi funzionali	pag. 33
5.12	Saggio di morte cellulare	pag. 34
5.13	Pazienti	pag. 34
5.14	Ricerca nell'uomo di autoanticorpi anti-OPN	pag. 34
5.15	Induzione dell'EAE	pag. 35
5.16	Preparazione del vaccino contro OPN	pag. 35
5.17	Immunizzazione attiva	pag. 36
5.18	Immunizzazione passiva	pag. 36
5.19	Valutazione della risposta anti-farmaco	pag. 36
5.20	Analisi statistiche	pag. 36
6.	RISULTATI	pag. 37
6.1	Produzione e purificazione delle molecole ricombinanti	pag. 37
6.2	Digestione enzimatica con trombina	pag. 41
6.3	Saggi funzionali	pag. 41
6.3.1	Effetti sull'apoptosi	pag. 42
6.3.2	Secrezione di IFN- γ	pag. 43
6.3.3	Secrezione di IL-17	pag. 43
6.3.3	Secrezione di TIMP-1	pag. 45
6.4	Ricerca di anticorpi anti OPN nel siero dei pazienti con SM	pag. 46
6.5	Immunizzazione contro OPN	pag. 48
6.6	Produzione di anticorpi anti-OPN	pag. 50

6.7	Riconoscimento di OPN da parte degli anticorpi anti-OPN	pag. 52
6.8	Valutazione dell'azione bloccante OPN degli anticorpi	pag. 53
6.9	Effetti dell'immunizzazione passiva contro OPN	pag. 53
7.	DISCUSSIONE	pag. 56
8.	BIBLIOGRAFIA	pag...
9.	ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI	pag.

1. PREMESSA

Durante il corso di dottorato ho partecipato alla realizzazione di alcuni progetti di ricerca in ambito immunologico che hanno portato a pubblicazioni su riviste scientifiche. Una linea di ricerca è stata finalizzata alla ricerca di variazioni genetiche associate all'insorgenza della *Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa* (ALPS). L'ALPS, è una malattia autoimmune dell'infanzia, caratterizzata da un disordine dell'omeostasi dei linfociti e causata da un difetto dell'apoptosi mediata da Fas, 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. La malattia è causata da mutazioni che causano un difetto funzionale del recettore di morte Fas, o del suo ligando FasL, o di caspasi 10. In una certa proporzione di pazienti la malattia è causata da un difetto genetico sconosciuto. Negli anni passati, nel nostro laboratorio è stata identificata una variante della malattia, priva della classica espansione di linfociti T DN nel sangue periferico e denominata *Dianzani's Autoimmune Lymphoproliferative Disease* (DALD). 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. Queste evidenze suggeriscono che mutazioni che colpiscono geni nella via di Fas possono essere necessarie ma non sufficienti allo sviluppo di ALPS/DALD e che alterazioni di altri geni possono influenzare lo sviluppo e il quadro clinico della malattia. In passato nel nostro laboratorio è stato dimostrato che varianti polimorfiche di perforina possono esercitare un ruolo modificatorio sul difetto ereditario di Fas e influenzare il quadro della malattia. Dal momento che perforina è coinvolta nella citotossicità cellulomediata, abbiamo indagato la presenza e il ruolo di variazioni nel gene UNC13D. Esso codifica per Munc13-4, una proteina coinvolta nella secrezione di perforina poiché regola l'esocitosi delle vescicole citolitiche prodotte dai linfociti T citotossici e dalle cellule NK. L'associazione tra questi due geni che è stata alla base della nostra indagine si basa anche sul fatto che alterazioni del gene di perforina e di Munc13-4 sono associate allo sviluppo della *Linfoistocitosi Emofagocitica Familiare* (FHL). Con queste premesse le regioni codificanti e regolatorie del gene UNC13D sono state sequenziate in 21 pazienti ALPS e 20 DALD, e i risultati paragonati alle sequenze ottenute da 61 controlli sani e 38 pazienti con Sclerosi Multipla. L'analisi ci ha permesso di identificare 4 variazioni missenso rare in eterozigosi in 3 pazienti ALPS: p.Cys112Ser, p.Val781Ile, p.Ile848Leu e p.Ala995Pro. Le ultime due hanno mostrato di formare un aplotipo. Cellule HMC-1 trasfettate con il cDNA corrispondente a queste variazioni hanno mostrato una ridotta esocitosi delle vescicole litiche, rispetto alle

cellule trasfettate con il costrutto wild-type, indicando che variazioni con perdita di funzione nel gene UNC13D, seppur rare possono essere un fattore di rischio per lo sviluppo dell'ALPS (Boggio E et al. Sottomesso a *PLoS One*).

Un altro lavoro finalizzato alla ricerca di variazioni con funzioni modificatorie sullo sviluppo dell'ALPS (Boggio E, et al. 2012) è stato basato sulla valutazione del ruolo patogenetico di un polimorfismo del gene di SAP (SLAM-Associated Protein). SAP è una proteina adattatrice intracellulare espressa da linfociti T, NK, NKT, eosinofili, piastrine e alcuni sottotipi di linfociti B. Essa è coinvolta nella regolazione della citotossicità delle cellule NK, nello sviluppo delle cellule NKT, nel priming dei linfociti Th2, e gioca un ruolo nello switch isotipico e nella sopravvivenza delle plasmacellule.

Dal momento che mutazioni deleterie a carico del gene di SAP risultano parzialmente protettive dall'insorgenza dell'ALPS nel modello murino MRLlpr/lpr, abbiamo investigato il ruolo di questo gene, localizzato sul cromosoma X, in 51 pazienti con ALPS o DALD e 534 controlli sani, mediante screening delle regioni codificanti e regolatorie del gene. L'analisi ci ha permesso di identificare la presenza di 3 SNP significativamente associati con l'ALPS/DALD: -346C>T, -631G>A e -494G>A. Il primo di essi era particolarmente interessante perché un potenziale sito di metilazione. La frequenza allelica di questo polimorfismo è stata diversa nei soggetti di sesso maschile, nei pazienti rispetto ai controlli sani (61% vs 36%, p=0,01), con frequenze simili in ALPS e DALD. Al contrario nessuna differenza è stata riscontrata tra pazienti e controlli di sesso femminile. Inoltre la presenza della variante -346T si è dimostrata un fattore predisponente per lo sviluppo dell'ALPS/DALD in quanto associata con aumentati livelli di SAP. Pertanto i pazienti con ALPS e DALD hanno mostrato un'aumentata frequenza dell'allele -346T, con conseguente assenza del sito di metilazione in posizione -347C, e aumento dell'espressione di SAP da parte di cellule NK e linfociti T CD8⁺. Inoltre questo allele si associa ad una riduzione della secrezione di IFN- γ , una citochina capace di aumentare l'espressione di FasL da parte dei linfociti Th, suggerendo la possibilità di una relazione opposta tra Fas e SAP, e aprendo la strada a strategie terapeutiche per la cura di questa malattia.

Un'altra linea di ricerca a cui ho collaborato è stata incentrata sullo studio degli effetti dell'interazione tra ICOS e B7h. ICOS (*Inducible costimulator*) è una molecola costimolatoria appartenente alla famiglia del CD28, selettivamente espressa da linfociti T attivati. Il ligando di ICOS è B7h, espresso costitutivamente dai linfociti B, macrofagi e cellule dendritiche, e da monociti in seguito all'attivazione. B7h è espresso anche da cellule endoteliali, fibroblasti e

cellule epiteliali. L'interazione B7h-ICOS ha un ruolo fondamentale nella cooperazione linfociti B/linfociti T. È coinvolta nello sviluppo della memoria dei linfociti B e nello switching isotipico delle immunoglobuline, e gioca un ruolo nel differenziamento e nell'attivazione dei linfociti T sia a livello degli organi linfatici secondari sia a livello del sito infiammatorio.

In un lavoro recentemente sottomesso abbiamo valutato il ruolo dell'interazione B7h-ICOS nel differenziamento dei linfociti T naive, con particolare attenzione agli effetti sulla produzione di linfociti Th17 e Th9, che stanno emergendo come popolazioni cellulari patogenetiche in diverse malattie (Mesturini et al sottomesso a *Cytokine*). Lo studio è stato effettuato utilizzando la forma solubile del ligando di ICOS (B7h-Fc) in esperimenti di stimolazione *in vitro*, e paragonando gli effetti con quelli ottenuti mediante la stimolazione della molecola costimolatoria "classica" CD28 (stimolata con la forma solubile del suo ligando, B7.1-Fc). I risultati ottenuti indicano che B7h e B7.1 giocano ruoli differenti nella modulazione del differenziamento di queste due categorie di Th. La stimolazione con B7h induce la contemporanea secrezione della citochina pro-infiammatoria IL-17A e della citochina regolatoria IL-10, e potrebbe quindi giocare un ruolo modulatore dell'azione patogenetica dei Th17. Queste informazioni potrebbero essere importanti per la produzione e la messa a punto di molecole immunomodulatorie capaci di interferire con la costimolazione mediata da ICOS o CD28, e potenzialmente utilizzabili per il trattamento di tumori e malattie autoimmuni.

Nel lavoro di Occhipinti et al. abbiamo voluto valutare il *reverse signaling* mediato da B7h in seguito al legame da parte di ICOS. Questo lavoro è stato ispirato da un lavoro precedente del nostro laboratorio nel quale è stato dimostrato che il legame tra ICOS e B7h inibisce in maniera significativa la capacità delle cellule endoteliali di aderire a diverse linee cellulari tumorali e a cellule polimorfonucleate. Pertanto l'interazione tra ICOS e B7h potrebbe indurre segnali coinvolti nel modulare la diffusione delle metastasi tumorali e il reclutamento dei polimorfonucleati nel sito infiammatorio. Inoltre abbiamo voluto valutare gli effetti di questa interazione sulla maturazione delle cellule dendritiche (CD) e sulla loro capacità di presentare l'antigene, dal momento che nel topo la stimolazione di B7h induce una maturazione parziale delle cellule dendritiche immature, specializzate nell'uptake e nel processamento dell'antigene nei tessuti periferici.

I risultati mostrati indicano che la stimolazione di B7h tramite la proteina di fusione ICOS-Fc sia in grado di modulare in maniera sostanziale la maturazione di CD indotta da LPS, influenzandone la secrezione citochinica e la loro capacità di modulare la differenziazione e

l'attivazione dei linfociti T. Inoltre, questa interazione altera il loro reclutamento nei tessuti a livello della sede infiammatoria inibendone l'attività migratoria. Il trattamento con ICOS-Fc incrementa la produzione di IL-23 da parte di CD mature, citochina chiave per l'espansione dei linfociti Th17, i quali secernono IL-17. In linea con la secrezione di IL-23 è stato riscontrato un aumento della produzione di IL-17 da parte di linfociti T in un sistema di coltura linfocitaria mista. Quindi l'interazione B7h:ICOS-Fc tra CD e linfociti T è in grado di supportare un segnale bidirezionale in grado di favorire un fenotipo Th17.

Benchè siano necessari ulteriori studi, questo lavoro suggerisce un possibile impiego della molecola ICOS-Fc come agonista del *signaling* mediato da B7h. Questa molecola potrebbe essere un utile strumento immunomodulatorio utilizzabile in ambito anti-tumorale.

Il lavoro di cui mi sono principalmente occupata durante il mio dottorato è stato finalizzato allo studio del ruolo di osteopontina nella patogenesi della Sclerosi Multipla. Questo lavoro non ha ancora portato ad una pubblicazione scientifica. Il rationale e i risultati ottenuti sono l'oggetto di questa tesi.

2.RIASSUNTO

La Sclerosi Multipla (SM) è una malattia autoimmune degenerativa che colpisce il sistema nervoso centrale. È una malattia ad eziologia multifattoriale mediata da linfociti autoreattivi che attaccano la mielina, con conseguente difetto nella conduzione dell'impulso nervoso, e sintomi neurologici estremamente variabili. Nel 70% dei casi esordisce con una forma recidivante e remittente (RR) in cui si hanno attacchi improvvisi seguiti da periodi di remissione anche totale di durata di tempo variabile. Dopo un periodo di circa 20 anni in genere il decorso diventa progressivo (forma "secondaria progressiva" SP) con accumulo della disabilità nel tempo. In circa il 10% dei casi, la malattia è progressiva fin dall'inizio configurando la forma "progressiva primaria" PP.

Osteopontina (OPN) è una glicoproteina acida fosforilata che funziona sia come proteina della matrice extra-cellulare sia come citochina libera 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. Le funzioni pleiotropiche della molecola sono inoltre correlate alle numerose modificazioni post-traduzionali cui essa può essere soggetta.

Livelli elevati di OPN si ritrovano nel siero e nel plasma dei pazienti con SM. OPN è la citochina maggiormente espressa nelle placche demielinizzanti di pazienti con SM e di topi con encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE), il modello murino della malattia. Topi OPN^{-/-} sviluppano un quadro EAE meno severo dei topi WT, e il loro trattamento con OPN induce un'immediata ricaduta. *In vitro*, OPN induce la proliferazione dei linfociti T, la produzione di citochine Th1 e Th17 e inibisce la morte linfocitaria. Nelle lesioni OPN è prodotta ad elevati livelli nella matrice extracellulare della barriera ematoencefalica ricca di linfociti. In questa sede potrebbe giocare un ruolo importante nel reclutamento dei linfociti attraverso la barriera ematoencefalica. Tale processo è garantito dall'integrina $\alpha4\beta1$, bersaglio del farmaco anti-SM Natalizumab. OPN lega l'integrina $\alpha4\beta1$ solo dopo taglio proteolitico ad opera della Trombina che genera due frammenti (N- e C-terminale) e smaschera due siti di legame per l'integrina $\alpha4\beta1$ nel frammento N-terminale. Il frammento C-terminale invece contiene un sito di legame per CD44 coinvolto nell'inibizione dell'apoptosi linfocitaria. Questa caratteristica di OPN suggerisce che durante l'infiammazione, l'attivazione della trombina e il conseguente taglio di OPN porta alla formazione

di due frammenti che potrebbero giocare ruoli diversi rispetto alla molecola intera. Per questo abbiamo voluto studiare il ruolo patogenetico di OPN nella SM attraverso il mappaggio del ruolo funzionale giocato dai due frammenti generati dalla Trombina.

Sono mostrati i seguenti risultati:

- i. Sono state prodotte le proteine ricombinanti corrispondenti alla molecola intera sia umana che murina, e ai corrispondenti frammenti generati dal taglio della trombina. Inoltre, sia per la molecola umana che per quella murina, è stato prodotto un quarto costrutto corrispondente alla molecola intera ma mutata nel sito di taglio della trombina, e quindi incapace di generare i due frammenti N- e C-terminale. Tutte le proteine ricombinanti sono state prodotte in un sistema di espressione eucariotico che ha consentito di ottenere proteine con le corrette modificazioni post-traduzionali. Tale sistema di produzione proteica è stato ottimizzato al fine di massimizzare la produzione delle proteine ricombinanti.
- ii. Le molecole ricombinanti prodotte sono state testate per la capacità di proteggere linfociti T attivati dalla morte cellulare indotta dall'attivazione (AICD). I risultati ottenuti mostrano che gli effetti della molecola intera da noi prodotta sono sovrapponibili a quelli della molecola commerciale. Inoltre entrambi i frammenti che derivano dal taglio della trombina possiedono effetti anti-apoptotici ($p < 0.05$).
- iii. Sono stati valutati gli effetti sulla secrezione di citochine pro-infiammatorie quali IFN- γ e IL-17, una citochina coinvolta nella patogenesi della SM. La molecola intera da noi prodotta ha mostrato la capacità di indurre la secrezione di queste citochine agli stessi livelli della molecola commerciale. Entrambi i frammenti N- e C-terminale sono coinvolti nell'induzione della secrezione di IFN- γ , mentre la secrezione di IL-17 è dovuta al frammento N-terminale di OPN ($p < 0.05$).
- iv. Infine sono stati valutati gli effetti della stimolazione con le diverse molecole ricombinanti sulla secrezione di TIMP-1, un inibitore delle metalloproteasi dotato di attività anti-apoptotiche su diversi tipi di cellule. Tutte le proteine ricombinanti di OPN hanno indotto secrezione di TIMP-1 a livelli significativi ($p < 0.05$) anche se gli effetti del frammento N-terminale sono stati leggermente inferiori.

I risultati ottenuti saranno approfonditi attraverso la somministrazione delle molecole murine *in vivo* e la valutazione dei loro effetti sull'insorgenza e il decorso della malattia. Anche se preliminari, questi risultati suggeriscono che i due frammenti di OPN potrebbero essere utilizzati come target per la messa a punto di strategie terapeutiche per la Sclerosi Multipla.

Esistono diverse evidenze del fatto che autoanticorpi contro citochine pro-infiammatorie sono prodotti in numerose malattie autoimmuni; essi rappresenterebbero un meccanismo di spegnimento della risposta immunitaria. OPN è una citochina pro-infiammatoria che gioca un ruolo importante nella patogenesi della SM e di altre malattie autoimmuni. Auto-anticorpi contro OPN sono stati individuati in pazienti con Artrite Reumatoide e osteoartrite, ma il loro ruolo nel processo patogenetico non è mai stato investigato.

Per questi motivi abbiamo voluto investigare la presenza/assenza di auto-anticorpi anti-OPN in pazienti con SM e verificare se essi si associano al quadro clinico della malattia.

Inoltre gli esperimenti di Chabas et al dimostrano che la somministrazione di un vaccino a DNA, codificante per OPN, è in grado di aumentare il titolo degli anticorpi anti-OPN, e ciò indirizza verso la ricerca di protocolli di immunizzazione contro OPN. Per questo motivo la nostra ricerca è stata finalizzata alla valutazione del possibile uso degli autoanticorpi anti-OPN a scopi terapeutici attraverso la messa a punto di strategie atte ad antagonizzare degli effetti patogenetici di OPN nella SM. In particolare abbiamo voluto eseguire studi pre-clinici per valutare l'effetto di una vaccinazione attiva contro OPN, volta ad educare il sistema immunitario a produrre anticorpi neutralizzanti contro la molecola, e di un'immunizzazione passiva contro OPN, utilizzando un anticorpo neutralizzante.

I risultati mostrati sono :

- i. La presenza di auto-anticorpi anti-OPN e' stata valutata mediante un ELISA indiretto messo a punto nel nostro laboratorio, che si è avvalso della disponibilità dei reagenti la cui produzione è descritta nella prima parte della tesi. L'analisi effettuata sul siero di 107 pazienti e 69 controlli ha mostrato livelli significativamente più elevati nei pazienti rispetto ai controlli ($p < 0.01$). Tale dato è stato anche confermato in WB. Stratificando i pazienti sulla base della forma clinica è stato possibile associare i più alti livelli alle forme PP o ai pazienti SP con malattia attiva ($p < 0.01$). Abbiamo quindi valutato l'antigenicità della risposta anticorpale che si è dimostrata essere diversa fra pazienti e questo suggerisce che un'immunizzazione passiva personalizzata potrebbe essere in futuro proposta nella terapia umana.
- ii. Per valutare l'uso di una vaccinazione anti-OPN come terapia, femmine C57BL/6 sono state vaccinate per quattro settimane con OPN cross-linkata ad ovalbumina prima dell'induzione dell'EAE. I risultati dimostrano che i topi vaccinati hanno prodotto auto-anticorpi contro OPN e che tali topi mostrano, rispetto ai topi di controllo, un decorso significativamente meno severo della malattia ($p < 0.01$).

- iii. In collaborazione con il Prof. Sblattero, tramite *screening* di una libreria fagica anticorpale, abbiamo identificato due anticorpi anti OPN. Uno di essi ha mostrato *in vitro* attività neutralizzante OPN. Dati preliminari indicano che il trattamento con questo anticorpo è efficace nel migliorare i sintomi clinici della malattia nel topo.

3. INTRODUZIONE

3.1 Aspetti generali dell'autoimmunità

Una delle caratteristiche dell'immunità acquisita è la capacità di discriminare tra antigeni *self* e *non-self*, facendo in modo che si sviluppi una risposta immunitaria solo contro sostanze estranee all'organismo e favorendo la tolleranza verso gli antigeni autologhi (fenomeno noto come *tolleranza al self*).

La tolleranza al *self* inizia durante lo sviluppo linfocitario quando i precursori dei linfociti B e T subiscono, rispettivamente nel midollo osseo e nel timo, un rigoroso processo di selezione clonale. Negli anni '60 si riteneva che la selezione negativa eliminasse tutti i linfociti autoreattivi e che le malattie autoimmuni fossero l'inevitabile conseguenza di errori in questo processo di delezione. In realtà i meccanismi di tolleranza centrale non sono sufficienti per eliminare tutti i linfociti potenzialmente autoreattivi dal momento che non tutti gli antigeni autologhi sono rappresentati a livello degli organi linfoidei centrali. A partire dalla fine degli anni '70 sono state ottenute numerose evidenze sperimentali del fatto che linfociti autoreattivi maturi circolanti sono normalmente presenti nei soggetti sani. Poiché la presenza di queste cellule non porta inevitabilmente allo sviluppo di quadri autoimmuni, la loro attività deve essere regolata attraverso meccanismi tollerogenici attivi in periferia, come l'anergia e la delezione periferica.

Inoltre, a livello periferico, linfociti debolmente autoreattivi possono essere regolati negativamente attraverso l'azione di citochine Th2 non infiammatorie prodotte da linfociti T differenziati (*immunomodulazione*) oppure attraverso l'azione di linfociti T regolatori capaci di esercitare una immunosoppressione dominante nei confronti dei linfociti autoreattivi.

Un meccanismo di controllo dell'autoimmunità è, inoltre, rappresentato dalla naturale tendenza delle risposte immunitarie ad auto-limitarsi. Quando le cellule del sistema immunitario si attivano si ha l'espressione di geni coinvolti nella proliferazione e nelle funzioni effettrici dei linfociti, ma contemporaneamente si induce anche l'espressione dei geni che determinano l'apoptosi della gran parte dei linfociti attivati, fenomeno noto come "*spegnimento della risposta immunitaria*". Questo processo è essenziale per garantire protezione nei confronti dell'autoimmunità: se i linfociti non vanno in apoptosi dopo che gli antigeni *non-self* sono stati eliminati, c'è il rischio che riconoscano per errore antigeni *self*. Tuttavia una piccola porzione di essi non muore ma permane come cellule memoria, importanti nelle successive stimolazioni da parte dello stesso antigene.

I sistemi di tolleranza al *self*, che normalmente proteggono ciascun individuo dai linfociti potenzialmente autoreattivi, possono in certi casi fallire. Questi fallimenti portano allo sviluppo di una risposta inappropriata del sistema immunitario contro tessuti *self*, fenomeno chiamato autoimmunità.

I fattori che possono determinare il passaggio da una potenziale autoreattività alla malattia autoimmune sono molteplici, ed includono gli agenti infettivi, spesso di tipo virale, i fattori ambientali, il sesso e la perdita delle cellule regolatorie.

Le infezioni possono scatenare la malattia attraverso vari meccanismi. La presenza, negli agenti infettivi, di antigeni simili ad antigeni *self* (fenomeno del “mimetismo molecolare”), può determinare una “cross-reattività” contro il *self* da parte della risposta anti-agente infettivo dopo che quest’ultimo è stato eliminato. Inoltre l’infezione può danneggiare i tessuti causando la liberazione di antigeni normalmente sequestrati, che non sono mai stati visti dal sistema immunitario e che sono quindi erroneamente riconosciuti come non *self*. Infine il processo infiammatorio cronico locale innescato dall’infezione nel tessuto, determina produzione di citochine e l’attivazione delle APC aumentandone la capacità di presentare gli antigeni e le capacità costimolatorie; la presenza di questo ambiente ipereattivo potrà permettere l’attivazione di linfociti T autoreattivi che non si sarebbero mai attivati in un contesto immunologicamente a riposo.

Anche i fattori ambientali contribuiscono allo sviluppo delle malattie autoimmuni anche se spesso il fattore ambientale scatenante resta ignoto. Inoltre, anche il sesso femminile è un fattore predisponente lo sviluppo di malattie autoimmuni: è stato dimostrato che la produzione massiva di estrogeni nella donna altera alcune funzioni dei linfociti B. Infine, anche alterazioni nel numero e nella funzionalità dei linfociti T regolatori CD4⁺CD25⁺ contribuiscono all’autoimmunità.

Un difetto dell’apoptosi può favorire una risposta autoimmune in differenti modi. In primo luogo le cellule apoptotiche esprimono in membrana autoantigeni inusuali per una cellula normale, e il rallentamento della morte cellulare rende questi antigeni *self* più esposti nel tempo. Oppure alterazioni del processo apoptotico possono scatenare fenomeni necrotici che, a differenza dell’apoptosi, determinano la comparsa di reazioni infiammatorie che favoriscono la presentazione di antigeni autologhi al sistema immunitario.

Le malattie autoimmuni colpiscono il 5-10% della popolazione dei paesi occidentali. Dal punto di vista clinico le malattie autoimmuni possono essere divise in due grandi categorie: quelle organo-specifiche e quelle sistemiche. Nella malattie autoimmuni organo-specifiche, la risposta immunitaria è diretta contro un antigene bersaglio espresso selettivamente da un certo organo, per cui le manifestazioni della malattia sono in gran parte limitate ad esso, come per esempio nel

diabete mellito di tipo 1, nella sclerosi multipla (SM) e nella tiroidite di Hashimoto. Nelle malattie autoimmuni sistemiche la risposta è diretta contro antigeni bersaglio espressi ubiquitariamente e coinvolge quindi più organi e tessuti, come ad esempio nella sindrome autoimmune linfoproliferativa (il cui acronimo è APLS) e nel lupus eritematoso (LES).

Dal punto di vista del meccanismo immunopatogenetico, le malattie autoimmuni possono essere mediate da anticorpi oppure da cellule. Le prime comprendono malattie come le emocitopenie autoimmuni, causate da autoanticorpi contro vari tipi di cellule del sangue, oppure il lupus eritematoso sistemico, causato dalla deposizione in vari tessuti di immunocomplessi formati principalmente da anticorpi contro complessi DNA-istoni o RNA-ribonucleoproteine e i rispettivi autoantigeni. Fanno parte di questa categoria anche alcune malattie autoimmuni organo-specifiche causate da autoanticorpi capaci di esercitare un'attività agonista o antagonista sull'organo bersaglio; ad esempio nel morbo di Graves-Basedow anticorpi anti-recettore del TSH causano iperfunzione tiroidea, mentre nella miastenia grave anticorpi contro il recettore dell'acetilcolina inibiscono la trasmissione dell'impulso neuromuscolare. Le malattie autoimmuni cellulo-mediate sono una categoria in continua crescita e sono mediate principalmente da linfociti T helper di tipo Th1 e Th17 e da linfociti T citotossici (Tc). Esempi di questo tipo di malattie autoimmuni sono il Diabete Mellito di tipo 1 oppure la Sclerosi Multipla in cui i linfociti T autoreattivi aggrediscono rispettivamente le cellule β del pancreas e la mielina del sistema nervoso centrale. In queste malattie si osserva spesso anche la produzione di autoanticorpi, che sono considerati utili marcatori dello sviluppo della malattia, ma questi sarebbero conseguenza del fenomeno dell'*epitope spreading* e avrebbero un modesto ruolo patogenetico.

L'autoimmunità presenta una eziologia multifattoriale in cui diversi fattori genetici associati a fattori scatenanti (età, sesso, background genetico, esposizione a fattori infettivi e ambientali) concorrono ad aumentare la suscettibilità della malattia stessa [1].

3.2 La Sclerosi Multipla (SM)

3.2.1 Epidemiologia

La SM è una malattia infiammatoria cronica del sistema nervoso centrale (SNC). Se si escludono i traumi, è la causa più frequentemente di disabilità neurologica nei giovani adulti. E' più frequente nel sesso femminile, e il rapporto femmine/maschi varia da 1,9 a 3,1. L'esordio è raro prima dell'adolescenza situandosi in genere fra i 20 e i 45 anni, con un picco d'incidenza per età intorno ai 30 anni.

E' diffusa in tutto il mondo, ma numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato una disomogeneità nella sua distribuzione geografica.

Si possono individuare zone ad alto rischio, con tassi di prevalenza uguali o superiori a 30 casi di SM definita per 100000 abitanti, comprendenti gli USA settentrionali, il Canada meridionale, l'Europa centro-settentrionale, l'Australia sud-orientale e la Nuova Zelanda; zone a medio rischio, con tassi compresi tra 5-25/100000, comprendenti l'Europa mediterranea, gli USA meridionale la popolazione bianca del Sud Africa; ed infine, zone a basso rischio, con tassi inferiori a 5/100000 comprendenti Asia, Africa, gli stati settentrionali del Sud America e i Caraibi. In Italia la prevalenza è di 20/100.000 con un numero totale di pazienti stimato di circa 50.000, con la più alta prevalenza in Sicilia e Sardegna.

La causa della SM non è ancora stata chiarita e diversi studi suggeriscono si tratti di una malattia multifattoriale che dipende da fattori ambientali, genetici, immunologici.

Il decorso della SM presenta caratteristiche variabili ed imprevedibili. Si distinguono tre tipi fondamentali di SM in relazione al decorso della malattia:

- a) nel 85% circa dei casi la malattia si presenta e procede per "poussée". In questa forma definita a "ricadute e remissioni" (**RR**) vi sono recidive imprevedibili durante le quali appaiono nuovi sintomi oppure i sintomi già presenti diventano più severi. I sintomi neurologici, che sono la controparte clinica dei fenomeni infiammatori che portano alla rottura della barriera emato-encefalica e alla formazione di nuove lesioni, sono seguiti da una remissione completa o parziale che può durare mesi o anche anni. Dopo un periodo variabile dall'esordio, in genere 5-20 anni, nella maggior parte dei casi il decorso diventa progressivo, con o senza ricadute sovrapposte, configurando la forma "secondaria progressiva" (**SP**).
- b) **SP**: questa variante della SM viene considerata come un secondo stadio della malattia, poiché si presenta nella maggior parte dei pazienti con SM RR. Si osservano attacchi acuti isolati ma la regressione, in questo caso, non è completa e tra un attacco e l'altro l'invalidità

progredisce. Con il tempo il numero di attacchi acuti si riduce mentre il grado di invalidità aumenta progressivamente.

- c) In circa il 10% dei casi, la malattia mostra un accumulo progressivo di sintomi neurologici irreversibili definendo la forma “progressiva primaria” (**PP**), dovuta a meccanismi immunopatologici parzialmente distinti [2]. Mancano gli episodici attacchi acuti, così come le remissioni. Solo occasionalmente si assiste a piccoli miglioramenti transitori.

Accanto a queste forme ne troviamo altre due: la forma benigna e la forma progressivo-ricidivante. La prima è caratterizzata da un recupero completo dopo uno o due recidive e non causa deficit permanenti. La diagnosi di una sclerosi di tipo benigno è molto difficile e può avvenire solo dopo 10-15 anni dall'esordio dei primi sintomi; questa forma è associata a sintomi meno severi generalmente legati ad una alterazione della sensibilità; mentre la forma progressivo-ricidivante caratterizzata da un decorso progressivo fin dall'esordio, con recidive seguite o meno da recupero. Gli intervalli tra una ricaduta e l'altra sono caratterizzati da una continua progressione della malattia, a differenza di una forma ricidivante-remittente dove l'intervallo che intercorre tra due ricadute è privo di progressione.

3.2.2 Fattori immunologici

Un insieme di dati clinici e sperimentali supportano l'ipotesi che si tratti di una malattia a genesi autoimmune. In particolare, questa ipotesi si fonda sulle seguenti osservazioni: a) nel contesto delle lesioni demielinizzanti sono presenti cellule infiammatorie [3;4]; b) la suscettibilità alla malattia è legata a geni importanti per il controllo della risposta immunitaria [5]; c) il decorso della malattia può essere modificato da terapie immunomodulanti [6;7]; d) si riscontrano alterazioni immunitarie quali la presenza di anticorpi oligoclonali nel liquor [8]. Una delle indicazioni più attendibili in favore di questa ipotesi è costituita dalle analogie cliniche e neuropatologiche con l'encefalomielite autoimmune sperimentale (acronimo inglese, EAE) [9]. L'EAE viene indotta attivamente, immunizzando l'animale suscettibile con proteine della mielina, oppure passivamente attraverso il trasferimento adottivo di linfociti T encefalito-gegni specifici per tali proteine [10;11]. E' mediata dai linfociti T CD4+ reattivi verso un epitopo dominante della proteina basica della mielina (MBP) nell'ambito del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II.

Si pensa che queste cellule appartengano alla popolazione linfocitaria Th1, caratterizzata dalla secrezione delle citochine proinfiammatorie IL2, IFN- γ , TNF- α . Infatti, si ottiene un beneficio terapeutico in molti modelli animali di EAE bloccando la via di trasduzione mediata dal TNF- α e polarizzando le cellule verso un fenotipo Th2.

Nonostante ciò, recenti studi hanno dimostrato come l'EAE e la SM non siano un esempio di univoca risposta Th-mediata ma che il meccanismo alla base sia più complesso. Infatti topi knockout per IFN- γ o per TNF- α sviluppano comunque una EAE anche se con una suscettibilità e severità diverse dai topi *wild-type* [12;13]. Inoltre, un'altra citochina a cui è stato imputato un ruolo nello sviluppo di questa malattia è IL-17. Nel 1999 infatti fu osservata la presenza di elevati livelli di tale molecola nel sangue e nel liquido cerebrospinale di pazienti SM. Recentemente sono stati pubblicati studi che dimostrano l'associazione tra lo sviluppo di placche demielinizzanti e l'accumulo di Th17 nel SNC e periferico; inoltre pazienti RR presentano elevati livelli di *retinoic acid-related orphan nuclear hormone receptor C* (RORC), noto fattore di trascrizione associato al differenziamento in senso Th17.

Nell'uomo i risultati, ottenuti dall'analisi molecolare della risposta T contro la MBP, hanno evidenziato che numerose porzioni della proteina sono riconosciute, nell'ambito di diverse molecole del complesso maggiore di istocompatibilità, da molteplici famiglie del TCR. Tali risultati, che discordano da quanto osservato nella EAE in cui la risposta immune è diretta contro un epitopo immunodominante, probabilmente sono dovuti alla profonda differenza genetica tra i roditori di laboratorio (ceppi "*inbred*") e l'uomo (specie "*outbred*").

Gli interventi sperimentali di terapia immunologica nell'uomo si sono focalizzati sul blocco dei cloni T CD4+ diretti contro le proteine della mielina, sulla polarizzazione verso un fenotipo Th2 o sul blocco della traduzione del segnale via TNF. Queste strategie molto efficienti nel classico modello EAE, non sono altrettanto valide nell'uomo ed a volte peggiorano il decorso della malattia. [14;15].

Anche i meccanismi umorali dell'immunità sembrano essere coinvolti nel danno neuronale. Nei pazienti con SM sono state documentate risposte anticorpali nei confronti della MBP, della glicoproteina associata alla mielina (MAG), della proteina proteo lipidica (PLP) e dell' α -B cristallina [16]. E' corretto ricordare che, ogni iniziale risposta dei linfociti T verso un autoantigene, può scatenare successivamente una risposta più diversificata contro altri autoantigeni, un fenomeno noto come "*epitope spreading*".

L'importanza di una risposta umorale è indicata dalla presenza di immunoglobuline oligoclonali presenti nel liquor in più del 90% dei casi di SM pur non rappresentando una specificità di questa malattia dal momento che si possono trovare in molte altre patologie infiammatorie del SNC come anche infettive o autoimmuni.

3.2.3 Patogenesi

E' universalmente accettato che il sistema immunitario svolga un ruolo chiave nella patogenesi della sclerosi multipla. Le prime evidenze indicavano i linfociti T CD4+ come mediatori chiave nella patogenesi della malattia, grazie a studi condotti sul modello animale murino (EAE) [17]. E' opinione comune che gli eventi iniziali dell'attivazione dei linfociti T avvengano in periferia dove i linfociti T incontrerebbero uno specifico autoantigene presentato da molecole del MHC-II in presenza di segnali costimolatori come B7-1 e B7-2 sulle cellule presentanti l'antigene. Queste cellule autoreattive potrebbero essere presenti a livello periferico come linfociti "quiescenti", senza manifestare il proprio potenziale autoaggressivo. Uno stimolo esterno, quale una malattia infettiva, potrebbe attivare questi linfociti.

Affinché possa iniziare una risposta immunitaria locale a livello del SNC, i linfociti T circolanti attivati in periferia devono attraversare la barriera ematoencefalica.

Il processo di diapedesi attraverso questa struttura, implica una complessa interazione tra a) molecole di adesione, b) chemochine, c) proteasi in grado di alterare la membrana basale, la matrice extracellulare e di degradare la mielina [18].

Nella fase successiva, i macrofagi e la microglia giocano un ruolo chiave. Questi elementi agiscono come APC a livello locale, perpetuando la demielinizzazione immunomediata attraverso: a) la fagocitosi, b) il rilascio di citochine, c) l'attivazione di proteasi, d) il rilascio di mediatori tossici. La reazione infiammatoria perciò aggredisce la mielina a livello del SNC producendo prima demielinizzazione e poi danno assonale, che induce un deficit neurologico irreversibile.

Dati recenti dimostrano un importante ruolo dei linfociti CD8+ [19]; esiste infatti una significativa correlazione tra la presenza dei linfociti CD8+ ed il danno assonale nelle lesioni sclerotiche [20]. Resta ancora da definire come i linfociti CD8+ contribuiscano alla patogenesi della malattia. Studi su modelli animali hanno suggerito sia un ruolo da "mediatori" sia da "soppressori" dell'infiammazione. Nel primo caso, le cellule CD8+ danneggerebbero direttamente gli assoni, a seguito del riconoscimento degli epitopi presentati su MHC-I espressi in superficie dagli assoni stessi o indirettamente, distruggendo le cellule gliali che presentano epitopi di classe I, lasciando gli assoni esposti ad un'altra forma di infiammazione. Nel secondo caso invece, il loro ruolo di "soppressori" si esplicherebbe nel diretto riconoscimento di molecole di classe I sulle cellule CD4+ [21]. Il contributo dei linfociti CD8+ al danno assonale potrebbe essere determinato dal rilascio di "mediatori" chimici.

3.3 Osteopontina (OPN).

3.3.1 Caratteristiche strutturali e funzionali

OPN è una glicoproteina acida fosforilata a livello di diversi residui di serina ed è implicata in eventi fisiologici e patologici tra i quali il rimodellamento osseo, l'infiammazione, il cancro, l'angiogenesi, le patologie cardiovascolari e le malattie autoimmuni [22-25]. OPN esiste come proteina immobilizzata nella matrice extra-cellulare, ma anche come citochina solubile nei fluidi biologici, dove agisce come importante componente dei processi infiammatori e della risposta immunitaria [26;27].

Fu inizialmente identificata come la più abbondante sialoproteina presente nel tessuto osseo [28], ma è stata successivamente ritrovata anche nella placenta, nel rene, nel muscolo liscio e nei leucociti.

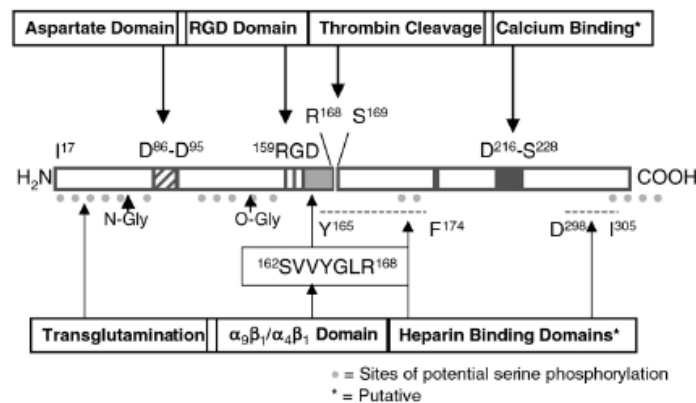
OPN è secreta principalmente dagli osteoblasti e dagli osteociti, dalle cellule epiteliali renali, dalle cellule del muscolo liscio, dalle cellule endoteliali, ma è anche abbondantemente espressa dai linfociti T e B attivati (fu identificata come *Early T-cells Activation* - Eta-1) dai monociti-macrofagi,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

OPN è codificata da un gene polimorfico formato da 7 esoni e 6 introni e localizzato nell'uomo sul cromosoma 4 (4q21-q25). Il suo peso molecolare varia tra 25 e 80 kDa in base alle modificazioni post traduzionali ai quali è sottoposta, tra cui glicosilazione, fosforilazione e clivaggio ad opera della trombina. In particolare, in seguito al taglio proteolitico operato dalla trombina, OPN espone la sequenza peptidica SVVYGLR importante per promuovere l'adesione delle cellule che esprimono le integrine $\alpha 9$ e $\alpha 4$. OPN subisce tagli proteolitici anche da parte delle MMP, in particolare della MMP-3 e della MMP-7. Inoltre, OPN possiede una sequenza tripeptidica "Arginino-Glicina-Aspartato" (RGD) a livello della quale può essere abbondantemente glicosilata. OPN attraverso il dominio RGD è in grado di interagire con le integrine $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$, favorendo i meccanismi di adesione di linfociti T e B, macrofagi, piastrine, osteoclasti, e cellule del muscolo liscio. È stato dimostrato che il legame di OPN con l'integrina $\alpha v\beta 3$ media la migrazione delle cellule endoteliali durante l'angiogenesi [29;30].

OPN è in grado di legare anche diverse isoforme di CD44, in particolare con CD44_{v6-7}. CD44 è una proteina di membrana glicosilata coinvolta nell'adesione e nell'*homing* dei linfociti. Questa interazione media la funzione chemotattica di OPN, riduce l'espressione di IL-10 e IL-4, e favorisce la produzione di IL-12 [31;32]. Il legame di OPN sia con CD44 sia con le integrine polarizza i linfociti T verso una risposta Th1 [33].

Sono state identificate tre isoforme di OPN che si generano in seguito a *splicing alternativo*: OPNa di 945bp che codifica per la proteina intera, OPNb di 903bp che presenta una delezione di 14

amminoacidi nell'esone 5 e OPNc di 864bp che presenta una delezione di 28 amminoacidi nell'esone 4 [34;35]. Inoltre, recentemente è stata identificata una forma intra-cellulare di OPN (iOPN) la quale viene generata a partire da un sito di inizio della trascrizione alternativo non-AUG, a valle di quello canonico, che determina la perdita del peptide segnale [36]. Il ruolo principale attribuito a iOPN è quello di inibire, da parte delle cellule dendritiche, la produzione di IL-27 potente inibitore della produzione di IL-17, favorendo quindi lo sviluppo di un fenotipo Th17 [37].



Rappresentazione schematica di OPN

3.3.2 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- α e IL-1, inducono la trascrizione di OPN attraverso l'attivazione di *Protein Kinase C* (PKC) [38].

OPN è una molecola con un duplice ruolo, pro- ed anti-infiammatorio. Per ciò che riguarda la sua azione pro-infiammatoria agisce come agente chemoattrattivo, favorisce l'adesione dei macrofagi e modula la funzione di macrofagi e linfociti T *in vitro* [39]. È noto che OPN è prodotta dai linfociti T nelle prime fasi di attivazione e che recluta e attiva i macrofagi a livello del sito infiammatorio. *In vivo*, la somministrazione subcutanea di OPN induce il richiamo locale di macrofagi [40]; mentre il legame con il recettore CD44, a livello dell'estremità C-terminale, promuove la chemotassi e l'attivazione dei macrofagi stessi [41].

OPN è coinvolta nell'infiltrazione macrofagica e linfocitaria in risposta a diversi stimoli *in vivo* ed è espressa dagli istiociti nei granulomi di varia natura come nella tubercolosi e nella sarcoidosi. Nel topo, OPN costimola i macrofagi, attivati da LPS, a produrre IL-12 ed inibisce la produzione di IL-

10. In linea con quest'osservazione, topi *knock-out* per OPN rispondono ad infezioni normalmente caratterizzate da una risposta di tipo Th1 con una ridotta produzione di IL-12 e un'aumentata produzione di IL-10 [42;43].

OPN influenza anche la differenziazione dei linfociti T, favorendo la produzione di IFN- γ e l'espressione di CD40L [44]. Recentemente è stato dimostrato che OPN induce sopravvivenza dei linfociti T attivati, attraverso la regolazione dei fattori di trascrizione *Forkhead Box O3A*, (Foxo3a) e NF- κ B [45;46].

La sua azione anti-infiammatoria è caratterizzata ma si pensa che OPN eserciti un effetto anti-infiammatorio inibendo la produzione di ossido nitrico attraverso l'inibizione di iNOS [47;48]. Inoltre, recentemente è stato dimostrato che OPN ha un effetto anti-infiammatorio durante la seconda esposizione all'antigene in corso di episodi allergici [49].

3.3.3 Ruolo nei tumori

OPN svolge un ruolo fondamentale anche nello sviluppo dei tumori esercitando i suoi effetti prometastatici interagendo con le integrine e con CD44. L'interazione tra OPN e CD44 aumenta la formazione di foci, l'invasione e la tumorigenesi, attraverso la via del segnale mediata dalla proteina chinasi Rac. Diversi studi hanno dimostrato che OPN protegge le cellule tumorali dall'apoptosi attivando la via di sopravvivenza di fosfatidilinositolo3chinasi(PI3K)-Akt [50].

OPN è iper-espressa in diversi tipi di tumore tra i quali tumore della mammella, della prostata, osteosarcomi, glioblastomi e melanomi [51]. Topi *knock-out* per il gene di OPN mostrano una ridotta capacità di formare colonie in *soft agar* e una più lenta comparsa del tumore *in vivo*. Il silenziamento genico di OPN nel topo, mediante la tecnica della *RNA interference*, ha dimostrato una soppressione dello sviluppo dell'adenocarcinoma al colon sia *in vitro* che *in vivo* [42].

3.3.4 Ruolo nelle malattie autoimmuni

Il ruolo di OPN nelle malattie autoimmuni può essere in parte spiegato con la sua azione pro-infiammatoria, che induce il reclutamento di leucociti nel sito di infiammazione e la polarizzazione in senso Th1 e Th17. Lo studio svolto su topi transgenici per OPN (OPN^{+/+}), overesprimenti la citochina, ha evidenziato un accumulo nella cavità peritoneale di un particolare tipo di linfociti denominati B1, associati alla produzione di autoanticorpi e iper-gammaglobulinemia [53].

Elevati livelli di OPN sono stati rilevati nelle lesioni cerebrali di pazienti affetti da SM. Inoltre, il topo *knock-out* per OPN sviluppa una forma più lieve di EAE, modello sperimentale della SM, con ricadute meno frequenti rispetto al topo *wild-type* [54]. OPN è una citochina chiave nell'EAE in

quanto ligando delle integrine αv regola l'attività degli oligodendrociti, principali responsabili del processo di rimielizzazione e favorisce la formazione della mielina [55].

Nell'artrite reumatoide (AR) l'espressione di OPN è elevata nei fibroblasti, nei macrofagi e nel liquido sinoviale, dove inibisce la produzione di ossido nitrico e di prostaglandina E_2 . Il topo *knock-out* per OPN mostra protezione dalla AR, confermando il ruolo di OPN nella patogenesi della malattia [56].

Inoltre, un possibile ruolo di OPN nello sviluppo di malattie autoimmuni, potrebbe essere spiegato dal fatto che OPN è in grado di favorire lo sviluppo di un fenotipo Th17, coinvolto nella patogenesi della SM, del LES e dell'AR [57-59]. Dati recenti di letteratura hanno dimostrato come OPN sia in grado di favorire la produzione di IL-17, inibendo l'espressione di IL-27, noto inibitore di IL-17 [60].

I ruoli svolti da OPN nello sviluppo dell'autoimmunità nell'uomo sono molteplici [61] e lo studio dei polimorfismi di OPN ha portato ad interessanti associazioni con alcune malattie autoimmuni.

Analisi genetiche, condotte nel nostro laboratorio, a carico del gene di OPN, hanno identificato alcuni polimorfismi del 3' UTR del gene che formano tre aplotipi (A, B e C). È stato dimostrato che i portatori degli aplotipi B e/o C presentano un rischio 8 volte maggiore di sviluppare ALPS, rispetto agli individui omozigoti AA. Nel caso della SM e del LES i portatori dei genotipi B e/o C presentano un rischio di sviluppare la malattia di 1.5 volte maggiore, rispetto ai portatori del genotipo AA [62;63]. L'incremento dei livelli di OPN è perciò da correlare alla frequenza del genotipo non-AA, associato ad un aumento dell'espressione basale di tale citochina. Inoltre il nostro laboratorio ha dimostrato che i diversi aplotipi di OPN correlano con la progressione e la severità della SM; come misura della progressione vengono correlati pazienti che evolvono dalla forma RR alla SP entro i dieci anni dall'esordio della malattia (progressione rapida) e quelli che permangono nella forma RR oltre i 10 anni (progressione lenta); la percentuale dei soggetti che presentano una progressione lenta della malattia si è mostrata significativamente più elevata nei pazienti portatori del genotipo AA, rispetto ai non-AA (85% vs 62%, $p=0.022$) [62].

Il genotipo AA risulta quindi essere protettivo nei confronti sia dello sviluppo dell'ALPS che nell'SM.

3.3.5 Ruolo nella Sclerosi Multipla

Il ruolo di OPN nella genesi della Sclerosi Multipla è stata studiata estensivamente. OPN è stata identificata come la citochina più abbondante presente nelle lesioni demielinizzanti della SM. I livelli di trascritto di OPN nelle placche delle lesioni cerebrali di pazienti con SM risultano superiori di 5 volte rispetto ai controlli [64]. Livelli significativamente elevati della proteina si

ritrovano nel plasma di pazienti che presentano la forma RR della malattia mentre i livelli plasmatici di OPN nei pazienti con la forma PP e SP sono simili a quelli dei controlli sani [65].

Nel modello murino di EAE la somministrazione di rOPN a topi OPN^{-/-} induce ricadute ricorrenti e un peggioramento della paralisi e dei deficits neurologici. Inoltre topi OPN-KO mostrano, rispetto ai topi wild type, un decorso della malattia significativamente più lieve, una maggiore velocità di ripresa, assenza di ricadute spontanee e una minore progressione nella forma SP [64;45]. Steinman L. e coll [66] hanno dimostrato che il legame di OPN all'integrina $\alpha4\beta1$ previene la traslocazione nucleare del fattore di trascrizione *forkhead box O3A* (FOXO3A) bloccando la trascrizione di geni pro-apoptotici come BIM, BAK e BAX; inoltre OPN aumenta la degradazione di I κ B- α con conseguente attivazione e traslocazione nucleare del fattore trascrizionale NF- κ B che up-regola l'espressione di geni anti-apoptotici e di citochine di tipo Th1 e Th17. La somma degli effetti di OPN sui fattori trascrizionali FOXO3A e NF- κ B porta, pertanto, alla sopravvivenza dei linfociti T autoreattivi. Questi risultati suggeriscono che OPN possa modulare l'eliminazione per apoptosi di linfociti infiltrati e di cellule infiammatorie nelle lesioni cerebrali di SM.

OPN potrebbe avere un ruolo nel reclutamento dei linfociti autoreattivi verso i tessuti cerebrali infiammati attraverso la membrana ematoencefalica. Infatti OPN è un membro delle Sibling (small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins) proteins [67] ed è secreta ad elevati livelli nella matrice extracellulare perivascolare durante l'induzione dell'EAE. I linfociti T esprimono l'integrina $\alpha4\beta1$ (anche nota come VLA4), che permette loro di legare *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM1) e osteopontina espresse dalle cellule endoteliali che circondano le venule. I linfociti T possono quindi andare incontro a diapedesi e attraversare la matrice extracellulare per entrare, infine, nel Sistema Nervoso Centrale. Qui la secrezione di citochine, OPN e altre molecole da parte dei linfociti T e della APC danneggia gli oligodendrociti che producono la mielina. Inoltre plasmacellule autoreattive possono produrre anticorpi mielina-specifici che danneggiano ulteriormente la guaina mielinica.

Anticorpi diretti contro le catene $\alpha4$ o $\beta1$ possono bloccare il legame dei linfociti T umani all'endotelio cerebrale infiammato e inibire l'insorgenza dell'EAE [68;69]. Queste evidenze sperimentali hanno portato allo sviluppo di un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro l'integrina $\alpha4\beta1$ (Natalizumab), attualmente in fase III della sperimentazione clinica. La somministrazione mensile del Natalizumab per un periodo di almeno due anni ha mostrato riduzione della frequenza delle recidive e delle lesioni nei due terzi dei pazienti trattati [70;71]. OPN è in grado di legare l'integrina $\alpha4\beta1$ solo dopo aver subito un taglio proteolitico ad opera della Trombina, che permette la formazione di due porzioni N- e C-terminale di uguale peso molecolare.

Il frammento N-terminale si caratterizza per l'esposizione di due siti criptici di legame per l'integrina $\alpha4\beta1$.

Il ruolo di OPN nella patogenesi della SM è supportata dalla scoperta di Chabas per cui i topi privi di OPN sono resistenti all'EAE progressiva e mostrano frequenti remissioni. Tuttavia è interessante notare che l'immunizzazione del topo con un plasmide codificante per OPN aumenta la produzione di anticorpi contro OPN e migliora il corso cronico dell'EAE se somministrato prima dell'induzione della malattia. L'induzione dell'EAE è di per se in grado di indurre la produzione di anticorpi anti-OPN e aumenta la risposta anti-OPN indotta dalla vaccinazione a DNA. [72]

3.4 I vaccini nelle malattie autoimmuni

I vaccini si propongono di indurre risposte immunitarie effettrici e/o di memoria contro l'antigene in esame per proteggere l'organismo dal corrispondente agente infettivo, oppure di indurre una risposta effettrice contro antigeni tumorali nel corso di neoplasie. Nelle malattie autoimmuni sono stati ad oggi valutati, in modelli animali, due tipi di vaccini. Il primo tipo sfrutta i linfociti T autoreattivi o gli epitopi da loro riconosciuti, per indurre una risposta inibitoria, o autoantigeni combinati con adiuvanti in grado di scatenare una risposta regolatoria piuttosto che una effettrice [73]. Tuttavia, quando riportati nell'uomo, questi modelli risultano scarsamente efficaci, probabilmente perché linfociti autoreattivi e autoantigeni sono molto più eterogenei rispetto a quelli dei rispettivi modelli sperimentali.

Un secondo tipo di vaccino è usato per indurre risposte contro le citochine coinvolte nel danno autoimmune. Il razionale dell'utilizzo di questi vaccini si basa sul fatto che autoanticorpi contro citochine pro-infiammatorie sono stati individuati in diverse malattie autoimmuni, e si pensa neutralizzino l'aggressione autoimmune. Questi anticorpi, benché diretti verso antigeni *self* non sono patogenetici, come indicato dal fatto che essi sono generalmente presenti, seppur a bassi livelli, nel siero di individui sani [74-76]. Infatti, a differenza di quanto accade per i linfociti T, linfociti B capaci di secernere anticorpi anti citochine *self* possono essere presenti in circolo anche in condizioni di salute perché non sono sottoposti a selezione negativa (fenomeno conosciuto come *ignoranza al self*) [77]. Tuttavia la capacità del sistema immunitario di aumentare il titolo di questi anticorpi in risposta a eventi patofisiologici è limitata dall'assenza di corrispondenti linfociti T helper, e questo rende necessaria l'induzione di tali anticorpi mediante immunizzazione. Diversi studi hanno dimostrato che vaccini a DNA codificanti per citochine infiammatorie (TNF α , IL-12, IL-17, e IL-18) [2;78;79] stimolano la risposta anti-citochina e sono efficaci in diversi modelli animali di malattie autoimmuni. Tuttavia i vaccini a DNA sollevano diversi dubbi circa la sicurezza per la salute, per il rischio di sviluppare tumori (dati dall'integrazione del plasmide in protoncogeni), o malattie autoimmuni (aggressione delle cellule trasfettate) o, in particolare quando il bersaglio sono citochine pro-infiammatorie, l'aumento di suscettibilità ad infezioni.

Per questo motivo è preferibile utilizzare metodiche di immunizzazione attiva basate sull'utilizzo della citochina di interesse, modificata in modo da aumentarne l'immunogenicità e somministrata insieme a una proteina carrier in grado di rompere la tolleranza immunologica dei linfociti B e di indurre la produzione di elevati livelli di anticorpi neutralizzanti. Questa strategia di vaccinazione offre il vantaggio di determinare la produzione di una risposta efficace duratura nel tempo, che può essere mantenuta attraverso iniezioni di richiamo successive. Essa risulta pertanto utile nel trattamento di malattie croniche.

Una strategia alternativa finalizzata ad antagonizzare gli effetti patogenetici di una citochina è costituita dalla somministrazione di anticorpi neutralizzanti per via esogena. Diversi farmaci biologici, basati sul trasferimento passivo di anticorpi monoclonali, sono già utilizzati nella pratica clinica per il trattamento di neoplasie e malattie autoimmuni. Questa strategia di immunizzazione ha lo svantaggio di non essere in grado di indurre una memoria immunologica, e pertanto somministrazioni frequenti sono richieste per mantenere il titolo anticorpale a livelli terapeutici. Questo, sommato al fatto che le immunoglobuline chimeriche presentano un certo grado di immunogenicità, porta alla produzione di anticorpi anti-anticorpo, con conseguente perdita degli effetti benefici. La struttura modulare degli anticorpi e lo sviluppo delle metodiche di ingegneria genetica offrono la possibilità di agire sulle caratteristiche cliniche degli anticorpi al fine di ottimizzarne le proprietà terapeutiche. Inoltre l'immunizzazione passiva rappresenta una strategia di immunizzazione sicuramente maneggevole e offre l'importante vantaggio di poter essere interrotta in caso di reazioni avverse.

4. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo generale di questa tesi è stato quello di studiare il ruolo di OPN e di anticorpi anti-OPN nella patogenesi della SM. In particolare abbiamo voluto:

1. studiare il ruolo dei due frammenti generati di OPN generati dal taglio della Trombina; questo può fornire informazioni per la produzione di nuovi farmaci e garantire approcci terapeutici diversi;
2. cercare la presenza di anticorpi anti OPN nei pazienti con SM e correlarli con lo stato di malattia al fine di valutare il loro possibile uso come marcatori diagnostici e/o prognostici. Inoltre abbiamo voluto effettuare studi preclinici *in vivo* volti ad antagonizzare gli effetti patogenetici di OPN nel modello murino dell'EAE

5. MATERIALI E METODI

5.1 Clonaggio delle proteine ricombinati

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

I primers utilizzati per l'amplificazione sono i seguenti:

Per i costrutti OPNwt e OPN C-terminale

Primer forward: MiniBody BsiWI

5'ACGT**CGTACGT**GCCACCATGGGCTGGAGC3'

Primer reverse: OPN6xHisAscI

5'ACGT**GGCGCGCC**TTAGTGATGGTGATGGTGATGATTGACCTCAGAAGATGC3'

Per il costrutto OPN N-terminale

Primer forward: MiniBody BsiWI

5'ACGT**CGTACGT**GCCACCATGGGCTGGAGC3'

Primer reverse: OPN His N rev

5'ACGT**GGCGCGCC**TTAGTGATGGTGATGGTGATGAGAACCACCACCACCCCTCAGTC
CATAAACACAC 3'

Per i costrutti murini di OPNwt e OPN C-terminale

Primer forward: MiniBody BsiWI

5'ACGT**CGTACGT**GCCACCATGGGCTGGAGC 3'

Primer reverse: MsOPN6xHisAscI

5'ACGT**GGCGCGCC**TTAGTGATGGTGATGGTGATGGTTGACCTCAGAAGATGAACTC
3'

Per il costrutto murino di OPN N-terminale

Primer forward: MiniBody BsiWI

5'ACGT**CGTACGT**GCCACCATGGGCTGGAGC 3'

Primer reverse: MsOPN His N rev

5'ACGTGGCGCGCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGAACCACCACCACCCCTCAGTC
CATAAGCCAAGC 3'

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

Per produrre i costrutti mutati nel sito di taglio della trombina è stato necessario scomporre il cDNA di OPN in due pezzi, sfruttando la presenza di un sito unico di restrizione in prossimità degli aa da mutare. Sono stati disegnati due primers con orientamento forward specifici (uno per la molecola umana e uno per quella murina) mutati nelle triplette codificanti per gli aa desiderati. Tali primers sono stati utilizzati in una reazione di PCR con i primers revers che appaiano al 3' di OPN. Il pezzetto wild-type mancante è stato ottenuto per restrizione enzimatica. In particolare i primers utilizzati sono stati:

Per il costrutto OPN Mutata

Primer forward OPN mut Nde For

5' GGAATTCCCATATGATGGCCGAGGTGATAGTGTGGTTTATGGACTGAGCTTTAA
ATCTAAGAAGTTTCGC 3'

Primer reverse: OPN6xHisAscI

Per il costrutto murino di OPN Mutata

Primer forward MsOPN mut EagI For

5' CCAACGGCCGAGGTGATAGCTTGGCTTATGGACTGAGCTTTAAGTCTAGGAGT
TTCCAG 3'

Primer reverse: MsOPN6xHisAscI

Per gli anticorpi anti-OPN

Il cDNA corrispondente a ciascun costrutto è stato inserito tramite PCR nel vettore pHYGRO ingegnerizzato dal laboratorio del prof. Sblattero che consente di ottenere un prodotto di fusione con il dominio CH2 e CH3 delle IgG1 umane.

In particolare sono stati utilizzati i seguenti primers:

Primer forward: BsiwI sense

5' ACGTCGTACGTGCCACCATGGGCTGGAGC 3'

Primer reverse: AscI anti-sense

5' ACGTGGCGCGCCTTAAGTACTATCCAGGCCAG 3'

Ciascun amplificato è stato purificato con Exo-SAP-IT (GE Healthcare) e sequenziato per escludere la presenza di mutazioni mediante ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

1-3 µg di DNA plasmidico (pcDNA3.1 Hygro-FcHuman, Invitrogen, San Diego, CA) e di cDNA codificante per OPN sono stati digeriti per 2 ore a 37°C, in presenza degli enzimi di restrizione alla concentrazione di 1-2 U di enzima /µg DNA. I frammenti di DNA digeriti e purificati sono stati sottoposti alla reazione di ligazione usando l'enzima T4 DNA ligasi (Invitrogen) secondo le indicazioni fornite dalla ditta.

I prodotti della ligazione sono stati trasformati in batteri competenti del ceppo E. Coli JM109 (Promega Corporation, Madison, USA) mediante shock termico.

Per la preparazione dei plasmidi è stato utilizzato il kit di estrazione QIAGEN Plasmid Midi (QIAGEN), seguendo il protocollo fornito dal kit. Il DNA è stato recuperato in H₂O e quantizzato allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260nm-280nm.

5.2 Prova di tossicità

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

5.3 Trasfezione di cellule CHO-s e produzione di cloni stabili

Il giorno prima della trasfezione le cellule CHO-s sono state seminate in multi well da 48 pozzetti in 1ml di terreno CHOS-SFMII (Invitrogen) alla concentrazione di $0,5 \times 10^6$ cellule/ml e incubate a 37°C in atmosfera umidificata, al 5% di CO₂. La trasfezione è stata eseguita utilizzando il reagente FreeStyle MAX Reagent (Invitrogen), secondo le istruzioni fornite dalla ditta. La presenza di ciascuna proteina ricombinante nel surnatante di coltura è stata verificata mediante Western Blotting dopo 72h di coltura.

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

alcuni cloni cellulari, il cui surnatante di coltura è stato testato per Western Blotting per verificare la presenza della proteina ricombinante.

5.4 Western Blotting

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

I campioni ottenuti sono stati caricati su gel SDS-PAGE al 10% di acrilammide secondo protocollo standard (*Current Protocols in Molecular Biology*). I campioni sono stati quindi trasferiti su filtro di nitrocellulosa (Hybond-C Extra, GE Healthcare, Piscataway, NY, USA) per 1,5h a 100V in tampone di trasferimento (Tris base 3g/l, Glicina 14,4 g/l, SDS 1 g/l, Metanolo 10%). La nitrocellulosa è stata saturata con una soluzione di 5% di latte in TBS-T (Tris Base 24,2 g/l, NaCl 80 g/l ph 7,6 0,1% Tween-20), e quindi incubata 16 ore a 4°C con i seguenti anticorpi: Tetra-His Antibody (Qiagen) diretto contro il tag di 6 istidine, SPP1 Polyclonal Antibody (Thermo Scientific) diretto contro un epitopo C-terminale di OPN, Polyclonal anti-Osteopontin Antibody (Millipore) diretto contro un epitopo di OPN N-terminale. Per la rilevazione degli anticorpi anti-OPN è stato utilizzato un anticorpo diretto verso il tag SV5, gentilmente fornitoci dal laboratorio di Biologia Applicata gestito dal Prof. Sblattero. Successivamente il filtro di nitrocellulosa è stato incubato per 1h con anticorpo secondario coniugato ad HRP. Dopo 3 lavaggi in TBS-T, il filtro è stato incubato con i substrati specifici per chemiluminescenza (ECL Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare), ed il segnale luminoso emesso dalla reazione è stato utilizzato per impressionare i film da autoradiografia.

5.5 Coltura di cellule CHO-s ad alta densità

Le cellule sono state coltivate in terreno specifico CHO-S-SFMII (Invitrogen) addizionato di 1% penicillina, streptomina e gentamicina. $1,5 \times 10^6$ cellule/ml sono state seminate nella camera interna del CELLLine™ in un volume finale di 15 ml di terreno e coltivate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂, mentre il compartimento esterno è stato riempito di terreno. Le cellule sono state raccolte due volte alla settimana e il surnatante contenente la proteina ricombinante di interesse è stato raccolto in seguito a centrifugazione a 1500 rpm per 10 minuti e sottoposto a cromatografia per affinità.

5.6 Purificazione proteica

La purificazione delle proteine fuse al 6xHis tag è stata eseguita mediante cromatografia per affinità su colonna con resina al nichel Ni-NTA Resin (Qiagen) in un buffer costituito da 50mM NaH₂PO₄

pH8.0, 300mM NaCl, 10mM imidazolo. L'eluizione della proteina è stata effettuata in elution buffer (50mM NaH₂PO₄ pH8.0, 300mM NaCl, 250mM imidazolo).

La purificazione degli anticorpi anti-OPN è stata effettuata mediante cromatografia per affinità su protein A-Sepharose (GE Healthcare). La proteina è stata eluita mediante Glicina 0,1M pH2,7 e neutralizzata con 20% vol/vol di Tris Base 2M.

Le proteine purificate sono state dializzate ON contro PBS1X e quantizzate mediante densitometria su gel di Coomassie.

5.7 Digestione enzimatica con trombina

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

5.8 Saggio ELISA

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

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

Per la separazione dei PBMC è stato utilizzato sangue di donatori sani ottenuto da una sacca di sangue concentrato (Buffy coat) proveniente dal centro trasfusionale AVIS di Novara. Il sangue è stato diluito con PBS 1X, stratificato su Ficoll-Hypaque (Lympholyte-H, Cederlane Laboratories Hornby, Ontario, Canada) e centrifugato a 1800 rpm per 30 minuti.

Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI 1640 (Gibco) addizionato di 1% L-Glutammina, Antibiotici (Penicillina, Streptamicina, Gentamicina) e 10% FBS.

5.10 Separazione di linfociti T CD4⁺ e monociti daPBMC

Per la purificazione dei linfociti T CD4⁺ e dei monociti è stato utilizzato un kit commerciale (Milteniy-Biotec, Germany), il quale permette di effettuare una selezione negativa purificando solo la popolazione cellulare d'interesse, sfruttando anticorpi biotinilati successivamente coniugati ad anticorpi anti-biotina, legati a biglie magnetiche. Le cellule marcate ritenute nella colonna sono state eliminate, mentre le cellule non marcate di nostro interesse sono state eluite. La purezza delle cellule è stata valutata per mezzo di analisi immunofenotipiche ed è risultata sempre superiore al 95%.

5.11 Saggi funzionali

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

I linfociti T CD4⁺ sono stati piastrati alla concentrazione di 1×10^5 cellule/pozzetto in 100 μ l e in presenza di 1 μ g/mL di anticorpo anti-CD3 (clone OKT3) e di 1 μ g/mL di anti-CD28, precedentemente adesi alla piastra di coltura. Le cellule sono state stimulate o meno con 1 μ g/ml delle molecole ricombinanti intere o di quantità equimolari delle proteine corrispondenti ai frammenti generati dal taglio della trombina. La secrezione della citochina nel surnatante è stata valutata dopo 24h di coltura, mediante il kit ELISA Human IFN-gamma Cytokine (BioLegend, San Diego, CA, USA) seguendo il protocollo fornito dalla ditta.

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

Per valutare la produzione di TIMP-1 $0,1 \times 10^5$ di monociti sono stati seminati in una piastra da 96 pozzetti a fondo piatto in 100 μ l di terreno RPMI 1640 + 10% di FBS in presenza o meno delle diverse forme di OPN e lasciati incubare per 48 ore. La stimolazione è stata effettuata utilizzando 1 μ g/ml di rhOPN e quantità equimolari dei frammenti N- e C-terminali. Al termine della

stimolazione, i surnatanti delle colture sono stati raccolti e saggiati per la presenza di TIMP-1 utilizzando il kit ELISA DuoSet TIMP-1 (R&D Systems).

5.12 Saggio di morte cellulare

L'AICD (*Activation Induced Cell Death*) è stata valutata su linfociti T purificati da PBMCs e attivati con 1 µg/ml PHA (Sigma-Aldrich) al giorno 0. Le cellule sono state coltivate per 6 giorni in terreno RPMI 1640 (Gibco) addizionato di 1% L-Glutamina, 1% Penicillina, Streptamicina, Gentamicina, 10% FBS in presenza di 2U/ml di Interleuchina (IL)-2 (Sigma-Aldrich). Al sesto giorno di coltura 5×10^4 linfociti T sono stati seminati in presenza di 10 µg/ml di anti-CD3, in terreno RPMI 1640 + 5% FBS + 1U/ml IL-2 in presenza o assenza di 1 µg/ml di rhOPN (R&D Systems) o di quantità equimolari delle molecole ricombinanti home-made e coltivati per 18 ore. Per gli esperimenti di inibizione della funzione di OPN la stimolazione è stata effettuata in presenza di 10µg/ml del minibody. Le cellule vive sono state contate sfruttando la loro incapacità di incorporare il colorante Blue di Tripano. Il saggio è stato condotto in triplicato e i risultati sono espressi come % di sopravvivenza cellulare così calcolata: (totale delle cellule vive in ogni pozzetto del saggio/totale delle cellule vive in ogni rispettivo pozzetto di controllo) X 100.

5.13 Pazienti

Tutti i pazienti sono stati arruolati dalla clinica Neurologica dell'Università del Piemonte Orientale di Novara. I controlli sani sono stati scelti in base alla provenienza geografica, all'età e al sesso. Lo studio è stato approvato dal comitato etico dell'Ospedale Maggiore della Carità e i pazienti hanno dato per iscritto il loro consenso informato.

5.14 Ricerca nell'uomo di autoanticorpi anti-OPN

La ricerca di autoanticorpi anti OPN è stata effettuata sia mediante Western blotting che mediante ELISA.

Per il Western Blotting, 200ng di rhOPN sono stati sottoposti a SDS-PAGE e trasferiti su filto di nitrocellulosa (Hybond-C Extra, GE Healthcare, Piscataway, NY, USA) per 1,5h a 100V in tampone di trasferimento (Tris base 3g/l, Glicina 14,4 g/l, SDS 1 g/l, Metanolo 10%). La nitrocellulosa è stata saturata con una soluzione al 5% di latte in TBS-T (Tris Base 24,2 g/l, NaCl 80 g/l ph 7,6 0,1% Tween-20), per 1h a temperatura ambiente e successivamente incubata con il siero di pazienti con SM o di controlli sani, diluiti 1:40 in TBS-T+5% latte. La presenza di anticorpi nel siero è stata rilevata mediante l'utilizzo di un anticorpo anti-human coniugato con fosfatasi alcalina, e visualizzata in seguito all'aggiunta del substrato NBT/BCIP Stock Solution (18.75 mg/ml Nitro

blue tetrazolium chloride and 9.4 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt in 67% DMSO (v/v)) diluito 1:50 in AP Buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 9.5, 0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl₂). La reazione è stata bloccata mediante l'aggiunta di acqua distillata.

La quantizzazione del titolo degli auto anticorpi anti-OPN è stata valutata mediante un ELISA indiretto in cui 200ng della rhOPN sono stati adsorbiti su piastre ELISA mediante una incubazione overnight a 4°C. Ogni pozzetto è stato saturato con PBS-0,05%Tween e incubato per 1h a temperatura ambiente con in siero di ciascun paziente o controllo diluito 1:40 in PBS-0,05%Tween. La presenza degli auto anticorpi è stata rilevata mediante l'impiego di un anti-human coniugato HRP (BIO-RAD). La reazione è stata visualizzata con TMB (*Tetramethyl Benzidine*) (Sigma) e l'assorbanza letta a 450nm mediante BS1000 SpectraCount (Packard).

5.15 Induzione dell'EAE

L'induzione dell'EAE è stata eseguita in topi femmine C57B/6 di 8 settimane (Harlan Laboratories). Il protocollo ha previsto la somministrazione in tre iniezioni sottocutanee di 0,1ml di emulsione contenente 300µg di peptide MOG 35-55 in adiuvante incompleto di Freund, integrati con 500µg di Mycobacterium tuberculosis ucciso con il calore. L'immunizzazione con MOG 35-55 è stata seguita da somministrazione intravenosa di 400ng di tossina pertussica (Sigma-Aldrich) al giorno 0 e dopo 48 ore. I topi sono stati valutati ogni giorno dopo l'induzione per valutarne il peso e lo score clinico valutato su una scala con punteggi da 1 a 5 (0, nessun segno clinico, 1, perdita di tono della coda; 2, andatura barcollante; 3, paralisi degli arti posteriori; 4, paralisi degli arti posteriori e anteriori e 5, morte). Sono stati valutati l'esordio e il punteggio massimo della malattia espresso come media dei punteggi dei singoli topi \pm DS. Inoltre, è stata valutata la produzione degli anticorpi anti-OPN nel siero sia prima che dopo l'induzione dell'EAE con lo stesso saggio ELISA utilizzato per valutare la presenza di auto-anticorpi anti OPN nel siero umano.

5.16 Preparazione del vaccino contro OPN

OPN murina è stata cross-linkata ad ovalbumina al fine di aumentarne l'immunogenicità. Il legame è avvenuto in buffer fosfato 0,1M pH6 in presenza di 20mM di glutaraldeide. Le proteine sono state poste a interagire in un rapporto molare di 1:2 e incubate per 3h in agitazione a temperatura ambiente, e successivamente over-night a 4°C. L'avvenuto cross-linking è stato verificato mediante Western blot decorato con anticorpo anti OPN murina: Polyclonal anti-Osteopontin Antibody (Millipore), e con un anticorpo anti-OVA: Rabbit anti-OVA (Immunology Consult Laboratory)

5.17 Immunizzazione attiva

10 µg del complesso OPN-OVA risospesi in 50µl di buffer glicina 0,15M pH5.7 e 50µl di adiuvante incompleto di Freund sono stati iniettati sotto cute 1 volta alla settimana per 4 settimane in topi femmine C57BL/6 prima dell'induzione dell'EAE. Gli animali sono stati seguiti giornalmente per valutare l'incidenza della malattia, gli score clinici e la presenza di una risposta anti-OPN.

5.18 Immunizzazione passiva

50µg del minibody anti-OPN o del controllo isotipico (Sigma Aldrich) diluiti in 100µl di PBS sono stati inoculati intraperitoneo a topi femmine C57B/6 i giorni 5, 7 e 9 dopo l'induzione dell'EAE. Per l'immunizzazione terapeutica la somministrazione è stata effettuata giornalmente dopo la comparsa dei sintomi, dal giorno 12 al 17 dall'induzione dell'EAE.

5.19 Valutazione della risposta anti-farmaco

Il minibody anti-OPN utilizzato per l'immunizzazione passiva è stato adsorbito su poastre ELISA alla concentrazione di 10µg/ml in PBS mediante incubazione over-night a 4°C. I pozzetti sono stati saturati per 1 ora a 30°C con PBS-3%latte, e incubati con una diluizione 1:100 di ciascun siero effettuata in PBS-2% latte per 1 ora e 30 min a 30°C. I pozzetti sono stati lavati per 3 volte con PBS-0,05% Tween e per ulteriori 3 volte con PBS. La presenza di anticorpi diretti contro il minibody nel siero è stata rilevata grazie all'aggiunta di un anticorpo anti-Mouse coniugato ad HRP (GE Healthcare). La reazione è stata visualizzata con TMB (*Tetramethyl Benzidine*) (Sigma) e l'assorbanza letta a 450nm mediante BS1000 SpectraCount (Packard).\

5.20 Analisi statistiche

Il test impiegato per paragonare i risultati ottenuti nei saggi in vitro è stato il test di Wilcoxon per l'analisi dei dati appaiati. Per l'analisi dei risultati ottenuti nel dosaggio di anticorpi anti-OPN e per il confronto degli score clinici negli studi *in vivo* è stato utilizzato il test non parametrico di Mann-Whitney per il confronto dei dati non appaiati.

La significatività statistica è stata attribuita per valori di $p < 0.05$. Le analisi sono state effettuate impiegando il software GraphPad InStat (San Diego, California, USA).

6. RISULTATI

6.1 Produzione e purificazione delle molecole ricombinanti

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

In particolare sono stati clonati:

- il frammento N-terminale, che si estende dall' aa 17 al 168 ed espone la sequenza 162-SVVYGLR-168 responsabile della interazione con l'integrina $\alpha 4\beta 1$. Tale interazione potrebbe favorire la migrazione dei linfociti autoreattivi attraverso la barriera ematoencefalica;
- il frammento C-terminale, che si estende dall' aa 163 al 314, ed è responsabile della interazione con alcune isoforme del recettore CD44. Il ruolo patogenetico di questa interazione nella SM non è chiaro. Essa potrebbe mediare stimoli anti-apoptotici
- un mutante di OPN mancante del sito di taglio della trombina, localizzato tra gli aa R168 ed S169 che sono stati mutati in S168 e F169. Questo mutante è potenzialmente incapace di generare i due frammenti N- e C-terminale

Una identica strategia è stata utilizzata per clonare le proteine murine.

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

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

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

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

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

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

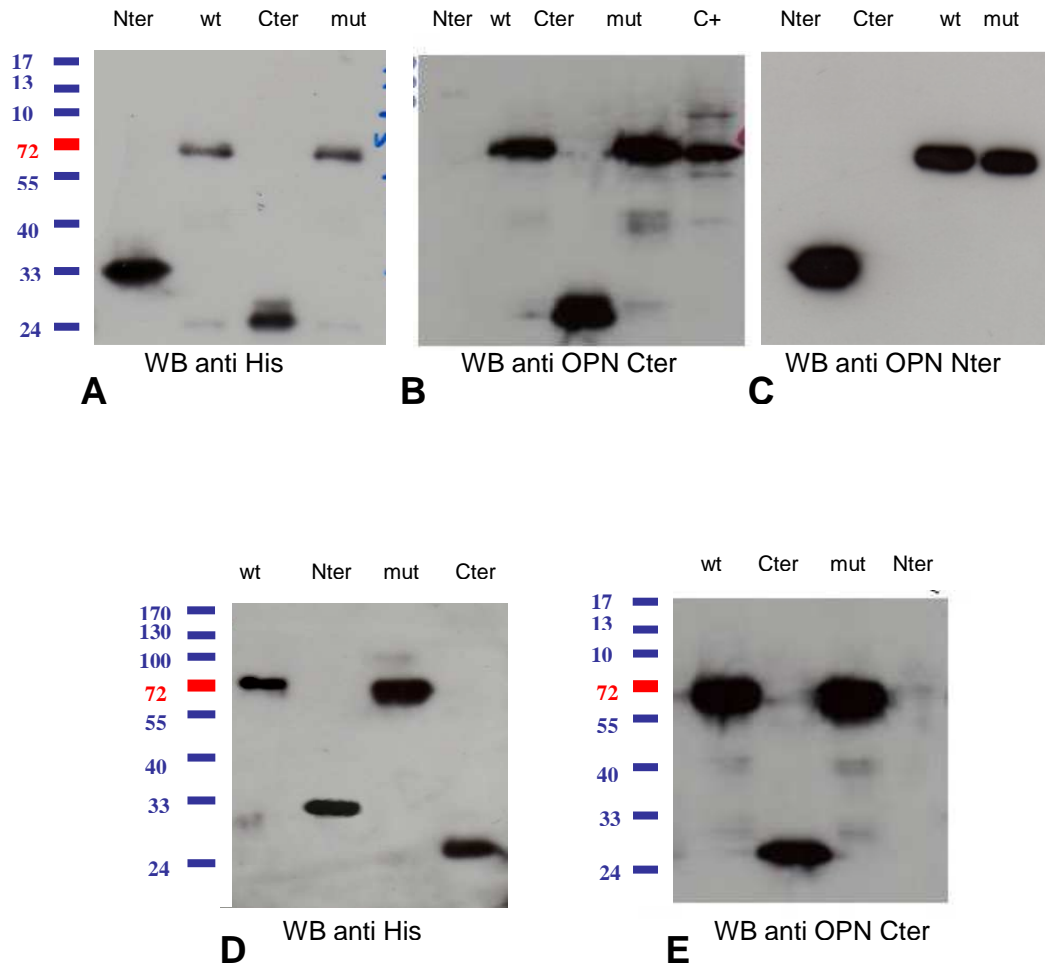


Figura 1 Western Blot dei surnatanti di coltura di cellule CHO-s trasfettate con i plasmidi codificanti i mutanti di OPN umana e murina, fusi al tag di 6 istidine. Questi surnatanti sono stati analizzati con anticorpi anti istidina (A, D), e specifici per un epitopo nella porzione C-terminale (B, E) o per un epitopo della porzione N-terminale di OPN (C).

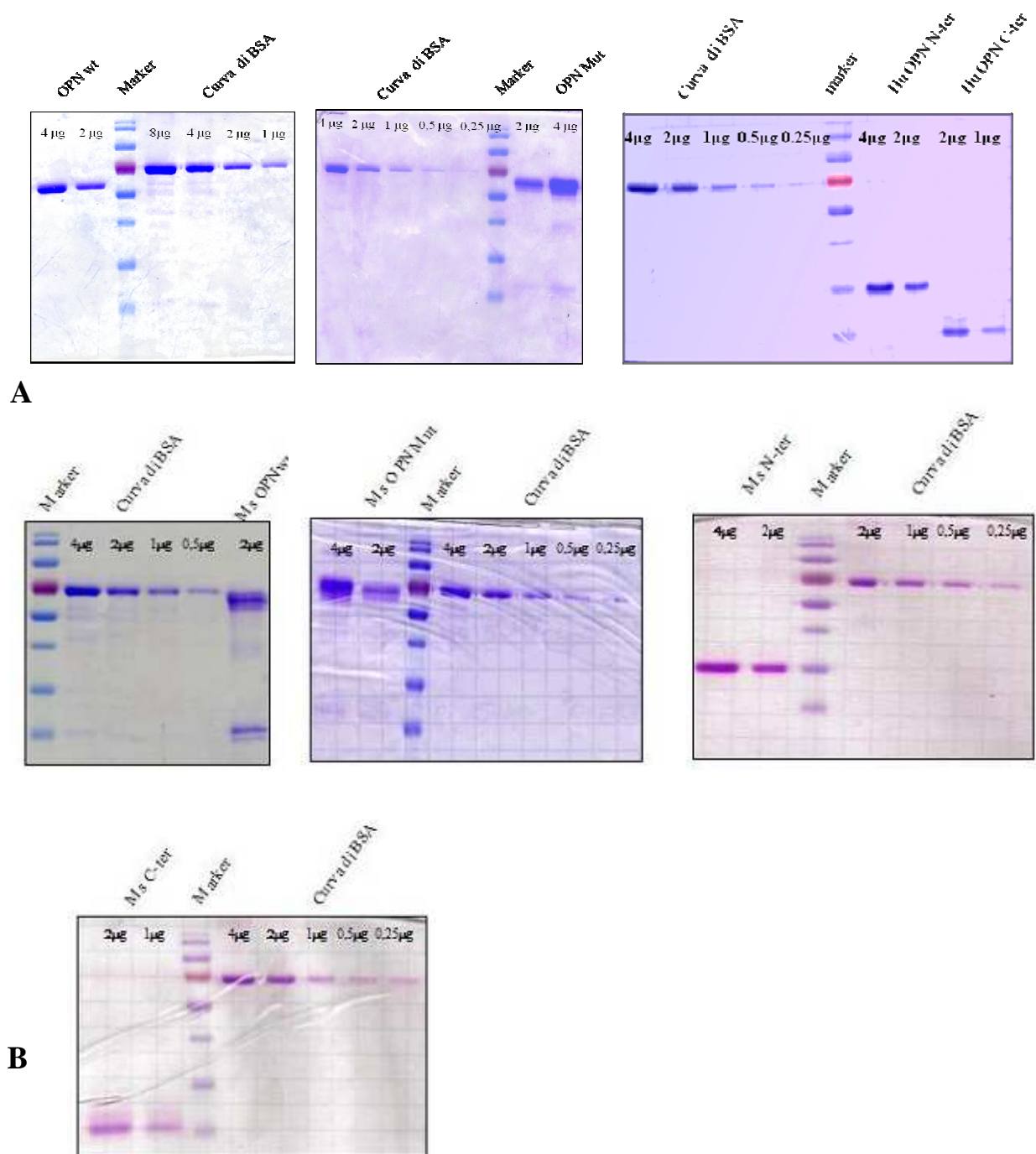


Figura 2. Quantificazione su gel di poliaccrilammide colorato con Coomassie Brilliant Blue.

I prodotti di purificazione di ciascuna proteina ricombinante sono stati valutati su gel di Coomassie per stabilirne la corretta concentrazione e verificare l'assenza di contaminanti. (A) gel relativi ai costrutti umani; (B) gel relativi ai costrutti murini.

6.2 Digestione enzimatica con Trombina

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

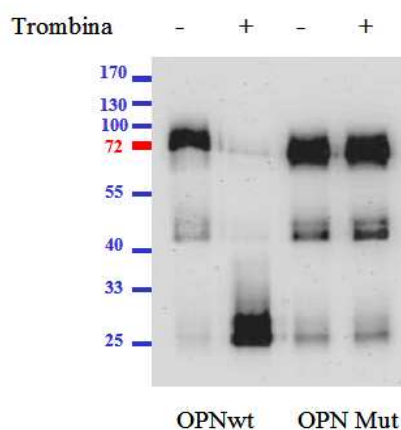


Figura 3 Western Blot delle proteine OPNwt-6xHis e OPN Mut-6xHis digerite con Trombina. Il prodotto della digestione operata dalla Trombina e le proteine non digerite sono state caricate su gel di poliacrilammide e sottoposti ad analisi wester blot decorato con anticorpo diretto contro l'epitopo di 6 istidine.

6.3 Saggi funzionali

Negli anni passati nel nostro laboratorio sono stati investigati gli effetti della somministrazione esogena di OPN sulla attivazione di PBMC e monociti, dimostrando che OPN gioca un ruolo nella produzione di IFN- γ , IL-17 e TIMP-1 e protegge i linfociti T dalla AICD (*Activation Induced Cell Death*). [62] Questi test sono stati utilizzati al fine di validare la funzionalità delle proteine ricombinanti da noi prodotte e di studiare il ruolo di ciascuno dei due frammenti generati dal taglio della trombina.

6.3.1 Effetti sull'apoptosi

Il saggio di protezione dalla morte cellulare è stato utilizzato per valutare la funzionalità e gli effetti delle proteine ricombinanti umane da noi prodotte. Il tasso di mortalità è stato valutato sfruttando l'incapacità delle cellule morte di espellere il colorante Blu di Tripano. La % di sopravvivenza è stata ottenuta paragonando il numero di cellule vive (non colorate) nel campione attivato con anti-CD3 in presenza delle proteine ricombinanti con il punto sperimentale condotto in loro assenza. I valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto al campione non trattato e paragonati a quelli ottenuti in presenza della proteina commerciale rhOPN. I risultati mostrano che OPN prodotta in laboratorio è in grado di inibire in maniera significativa la morte cellulare con un effetto del tutto paragonabile a quello della molecola ricombinante commerciale. Inoltre, entrambi i frammenti N- e C-terminale si sono dimostrati efficaci nella protezione dalla morte dei linfociti indotta dall'attivazione (**figura 4**). Da questi risultati è possibile concludere che OPN è un efficace fattore di protezione contro la morte cellulare indotta dall'attivazione e che questo effetto dipende dall'interazione con diversi ligandi riconosciuti dalle varie porzioni della molecola.

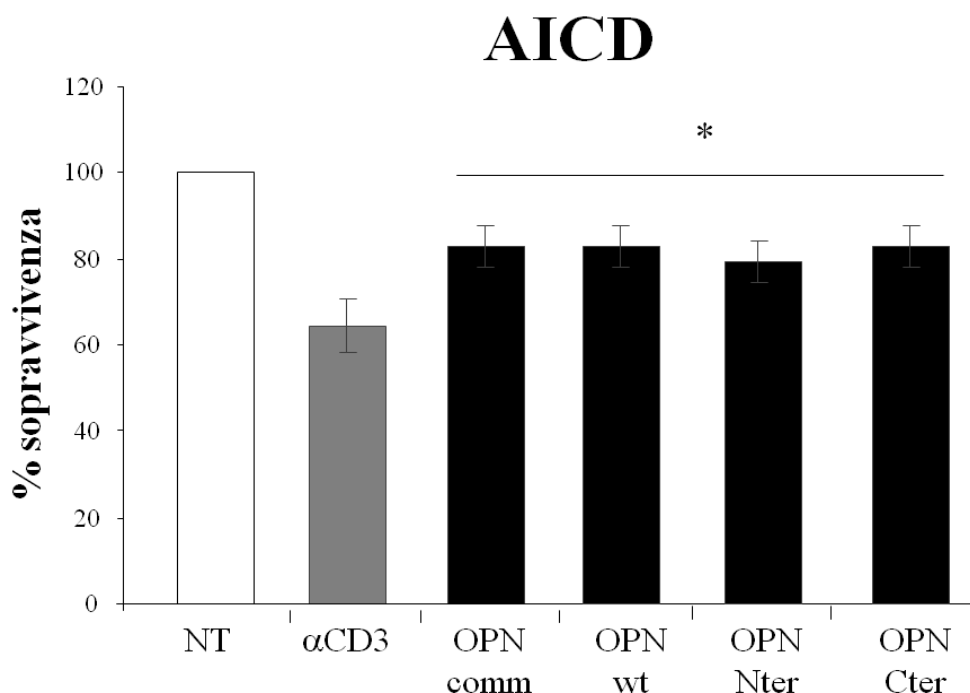


Figura 4. Effetti di OPN sulla sopravvivenza dei linfociti T. I linfociti T sono stati stimolati con anti-CD3 (10µg/ml) per indurre attivazione in presenza o in assenza 1µg/ml di OPN commerciale o delle differenti forme di OPN ricombinante home made a concentrazioni equimolari. I risultati sono espressi come % di sopravvivenza cellulare. Nel grafico sono rappresentate la media ± l'errore standard di 5 esperimenti indipendenti. * $p < 0,05$ rispetto alla condizione con il solo anticorpo anti-CD3 utilizzando il test di Wilcoxon.

6.3.2 Secrezione di IFN- γ

La funzionalità delle proteine ricombinanti rhOPN home-made è stata inoltre testata per la capacità di indurre secrezione di IFN- γ da parte di linfociti T CD4⁺ attivati con 1 μ g/mL di anticorpo anti-CD3 (clone OKT3) e di 1 μ g/ml di anti-CD28. Anche in questo caso gli effetti delle proteine ricombinanti da noi prodotte sono stati confrontati con quelli indotti dalla proteina rhOPN commerciale. I livelli di secrezione di IFN- γ da parte di linfociti T CD4⁺ in presenza di OPN home-made risultano sovrapponibili a quelli indotti in presenza della proteina commerciale, confermando la bontà della nostra preparazione proteica. Entrambi i frammenti sono risultati essere coinvolti nella secrezione di questa citochina (**figura 5**).

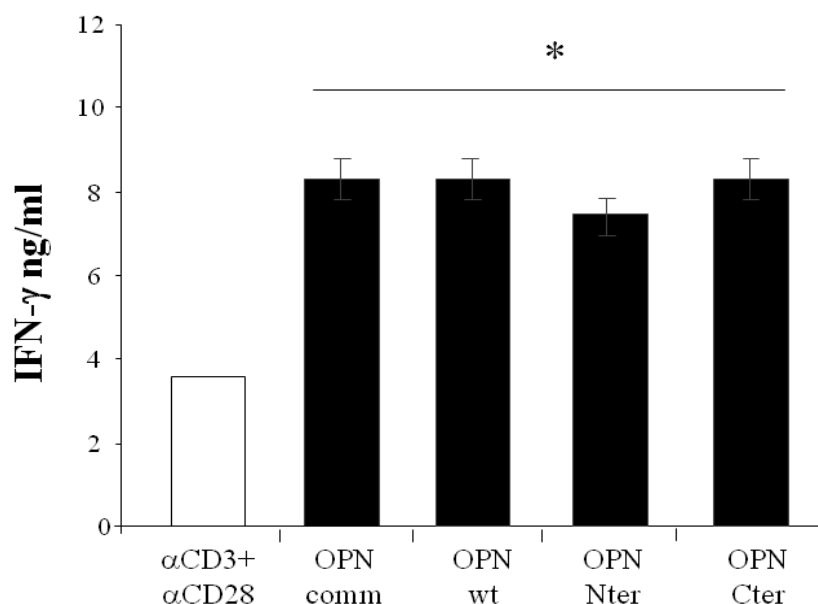


Figura 5. Effetti di OPN sulla produzione di IFN- γ da parte di linfociti T CD4⁺. I linfociti T CD4⁺ sono stati attivati con anti-CD3 (1 μ g/ml) e anti-CD28 (1 μ g/ml) in presenza o in assenza 1 μ g/ml di OPN commerciale o delle differenti forme di OPN ricombinante home made a concentrazioni equimolari. Nel grafico sono rappresentate la media \pm l'errore standard di 3 esperimenti indipendenti. * $p < 0,05$ rispetto alla condizione sperimentale condotta in assenza di OPN, utilizzando il test di Wilcoxon.

6.3.3 Secrezione di IL-17

Dal momento che IL-17 è coinvolta nella progressione della SM, e OPN è in grado di sostenere il fenotipo Th-17, è stato valutato quale fosse l'effetto delle nostre proteine ricombinanti sulla produzione di questa citochina da parte di linfociti T CD4⁺. I linfociti CD4⁺ sono stati attivati con

un anticorpo anti-CD3 e uno anti-CD28, in presenza di IL-6 e IL-1 β . IL-17 è stata dosata nei surnatanti delle colture cellulari dopo 5 giorni di stimolazione con i costrutti di OPN mediante saggio ELISA. Il basale, rappresentato dai linfociti T CD4⁺ stimolati con anti-CD3+anti-CD28, mostra un certo grado di secrezione di IL-17 se pur a livelli bassi, dimostrando l'attività intrinseca dei linfociti T di produrre la citochina in seguito ad attivazione. Si può osservare che la presenza di OPN induce e incrementa in maniera significativa la secrezione di IL-17. La molecola commerciale e la molecola home-made OPN inducono simili livelli di secrezione di IL-17. Al contrario il confronto dell'effetto esercitato dalle due porzioni N- e C-terminale dimostra che OPN N-terminale è significativamente più attiva nella induzione di IL-17 rispetto alla porzione C-terminale (**figura6**). Questi dati suggeriscono che antagonisti della porzione N-terminale di OPN potrebbero essere utilizzati per inibire la secrezione di IL-17 indotta da OPN.

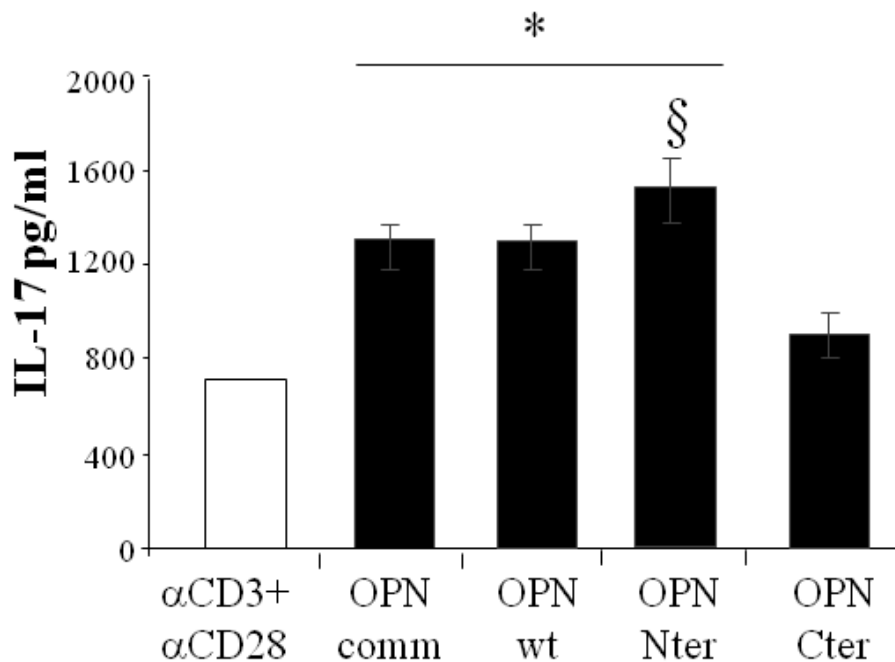


Figura 6. Effetti di OPN sulla produzione di IL-17 da parte di linfociti T CD4⁺. I linfociti T CD4⁺ sono stati stimolati con anti-CD3/anti-CD28 con aggiunta di IL-6 e IL-1 β in presenza o in assenza dei diversi costrutti di OPN ricombinante con il tag 6xHis a concentrazioni equimolari. I surnatanti sono stati raccolti al quinto giorno ed è stato valutata la secrezione di IL-17 mediante ELISA. Nel grafico sono rappresentate la media \pm l'errore standard di 7 esperimenti indipendenti. * $p < 0,05$ rispetto alla condizione con il solo anticorpo anti-CD3+anti-CD28; § $p < 0,05$ della condizione in presenza di OPN N-ter rispetto a quella con OPN C-ter, utilizzando il test di Wilcoxon.

6.3.4 Secrezione di TIMP-1

In passato è stato dimostrato che OPN è in grado di indurre secrezione di TIMP-1 da parte di monociti e che TIMP-1 inibisce, *in vitro*, sia l'AICD che la morte indotta da Fas dei linfociti T. Pertanto è stata studiata anche l'interazione funzionale tra OPN e TIMP-1, due molecole coinvolte nella risposta infiammatoria e nella patogenesi della SM. In particolare è stato valutato l'effetto dei diversi costrutti di OPN sull'espressione di TIMP-1 da parte di monociti *in vitro*. La valutazione della secrezione della proteina ha dimostrato che la popolazione dei monociti, in assenza di qualsiasi stimolo, è in grado di secernere TIMP-1 dopo 48 ore di coltura. Tutte le proteine ricombinanti sono state testate per la capacità di indurre secrezione di TIMP-1 da parte di monociti purificati da sangue periferico di donatori sani, e i loro effetti sono stati paragonati a quelli determinati dalla stimolazione con la rhOPN commerciale. La porzione N-terminale risulta avere un effetto minore, anche se significativo (**figura 7**). Questi dati suggeriscono che antagonisti di OPN e in particolare della porzione C-terminale potrebbero essere utilizzati per inibire la secrezione di TIMP-1 indotta da OPN.

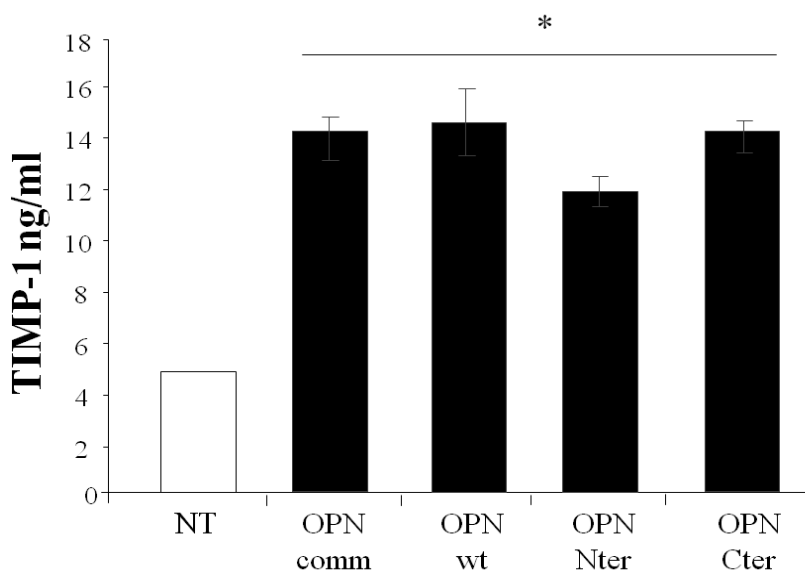


Figura 7. Effetti di OPN ricombinante sull'espressione di TIMP-1 da parte di monociti. I monociti sono stati stimolati con 1µg/ml di rhOPN o con concentrazioni equimolari dei frammenti N- e C-terminale. I surnatanti sono stati valutati in ELISA dopo 48h di stimolazione. Nel grafico sono rappresentate la media \pm l'errore standard di 6 esperimenti indipendenti. * $p < 0,05$ rispetto alla condizione senza alcun trattamento, utilizzando il test di Wilcoxon.

6.4 Ricerca di anticorpi anti OPN nel siero dei pazienti con SM

Dal momento che non sono disponibili kit commerciali per la ricerca di anticorpi anti OPN abbiamo deciso di mettere a punto un ELISA indiretto home made, sfruttando la disponibilità delle molecole ricombinanti di OPN (prodotte come descritto precedentemente), usate come antigene di cattura. Inoltre le stesse proteine sono state utilizzate dal gruppo del Prof. Sblattero per effettuare uno screening di una libreria fagica anticorpale. Questo screening ha permesso di isolare e produrre due anticorpi anti OPN (descritti successivamente); uno di essi è stato utilizzato come calibratore interno del saggio.

La **figura 8** mostra i risultati ottenuti espressi come unità arbitrarie calcolate sulla base dell'assorbanza data da quantità scalari dell'anticorpo anti OPN purificato, utilizzato come calibratore del test. L'analisi effettuata sul siero di 107 pazienti e 69 controlli sani ha permesso di identificare la presenza di anticorpi anti OPN e di rilevare che il loro titolo è significativamente aumentato nei pazienti con SM rispetto ai controlli (la media degli anticorpi anti-OPN rilevati è stata rispettivamente 11 µg/ml e 7,8 µg/ml) ($p < 0.05$). Stratificando i pazienti sulla base della forma clinica della malattia è stato possibile rilevare che i più alti livelli di auto-anticorpi si associano alle forme progressive della malattia o ai pazienti con malattia in fase attiva.

Risultati analoghi sono stati ottenuti utilizzando come antigene di cattura due diverse preparazioni commerciali della OPN (dati non mostrati). Inoltre al fine di valutare la specificità del test i sieri di pazienti SM e controlli sani sono stati testati in western blotting per valutare la loro capacità di riconoscere OPN ricombinante immobilizzata su un supporto di nitrocellulosa. Il 47% dei sieri dei pazienti (25 su 53 sieri testati) e il 32% dei controlli (12 su 26 sieri analizzati) sono risultati positivi per la presenza di anticorpi anti OPN. Anche in questo caso la differenza tra pazienti e controlli è risultata statisticamente significativa ($p < 0.05$) (**figura 9**).

Poichè le due porzioni N- e C-terminale di OPN che derivano dal taglio enzimatico operato dalla trombina potrebbero avere ruoli patogenetici diversi abbiamo voluto valutare la specificità della risposta anticorpale, che si è dimostrata diversa nei diversi pazienti (**figura 10**). Ciò suggerisce che un'immunizzazione passiva personalizzata potrebbe essere proposta come terapia per la SM.

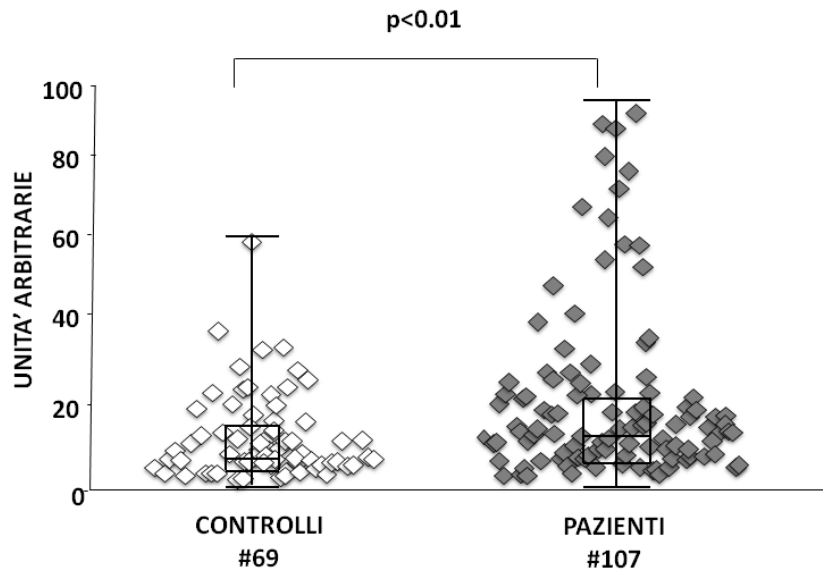


Figura 8: Dosaggio di anticorpi anti OPN nel siero di pazienti con SM. Gli anticorpi anti OPN sono stati rilevati mediante un ELISA indiretto home-made. L'analisi è stata effettuata su 107 pazienti con SM (quadrati grigi) e 69 controlli sani (quadrati bianchi). Le linee in nero rappresentano la mediana (8.4 $\mu\text{g/ml}$ nei pazienti vs 5.4 $\mu\text{g/ml}$ nei controlli) e i boxes il 25° e 75° percentile. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney U-test.

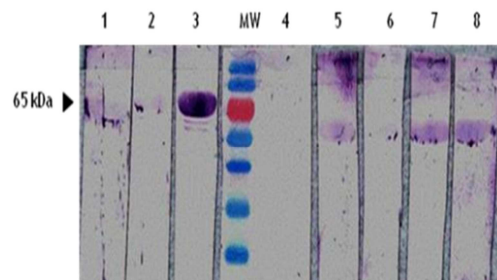


Figura 9: Analisi Western blot. La presenza di autoanticorpi anti OPN è stata verificata mediante analisi western blot. L'analisi è stata effettuata su 53 pazienti e 38 controlli. E' stata rilevata positività nel 47% e nel 32% dei casi, rispettivamente ($p < 0.05$).

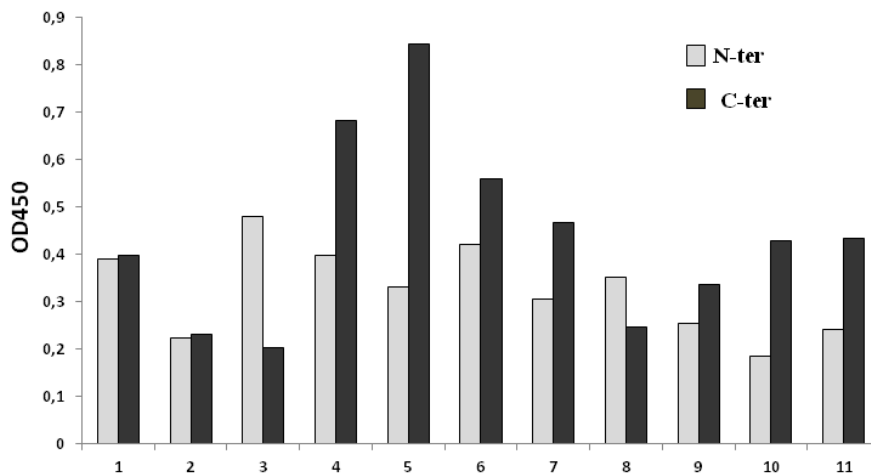


Figura 10. Valutazione della specificità antigenica. La specificità antigenica degli anticorpi anti OPN è stata valutata mediante ELISA indiretto home made utilizzando le proteine ricombinanti N- o C-terminale. Il grafico mostra i valori di OD450 ottenuti

6.5 Immunizzazione attiva contro OPN.

La vaccinazione contro OPN è stata effettuata utilizzando la proteina murina ricombinante da noi prodotta cross-linkata all'ovalbumina [80]. La formazione dei complessi OPN-OVA è stata verificata mediante Western Blotting decorato con anticorpo anti OPN e anti OVA (dati non mostrati). I complessi OPN-OVA sono stati somministrati a topi femmine C57B/6 settimanalmente per 4 settimane, prima dell'induzione della malattia. Come mostrato in **figura 11a** i topi vaccinati con OPN hanno mostrato un decorso della malattia significativamente migliore rispetto ai topi di controllo ($p < 0.05$). L'esordio della malattia è invece risultata uguale nei due gruppi di animali.

Inoltre, è stata valutata la produzione degli anticorpi anti-OPN nel siero degli animali sia prima che dopo l'induzione dell'EAE, con lo stesso saggio ELISA utilizzato per valutare la presenza di auto-anticorpi anti OPN nel siero umano. I risultati mostrati in **figura 11b** indicano che la vaccinazione con OPN è in grado di indurre la produzione di anticorpi anti-OPN. Tali anticorpi non sono presenti negli animali non immunizzati con OPN né negli stessi animali, prima dell'immunizzazione, e sono presenti prima dell'induzione della malattia. Inoltre tali anticorpi permangono nel tempo nel siero degli animali immunizzati.

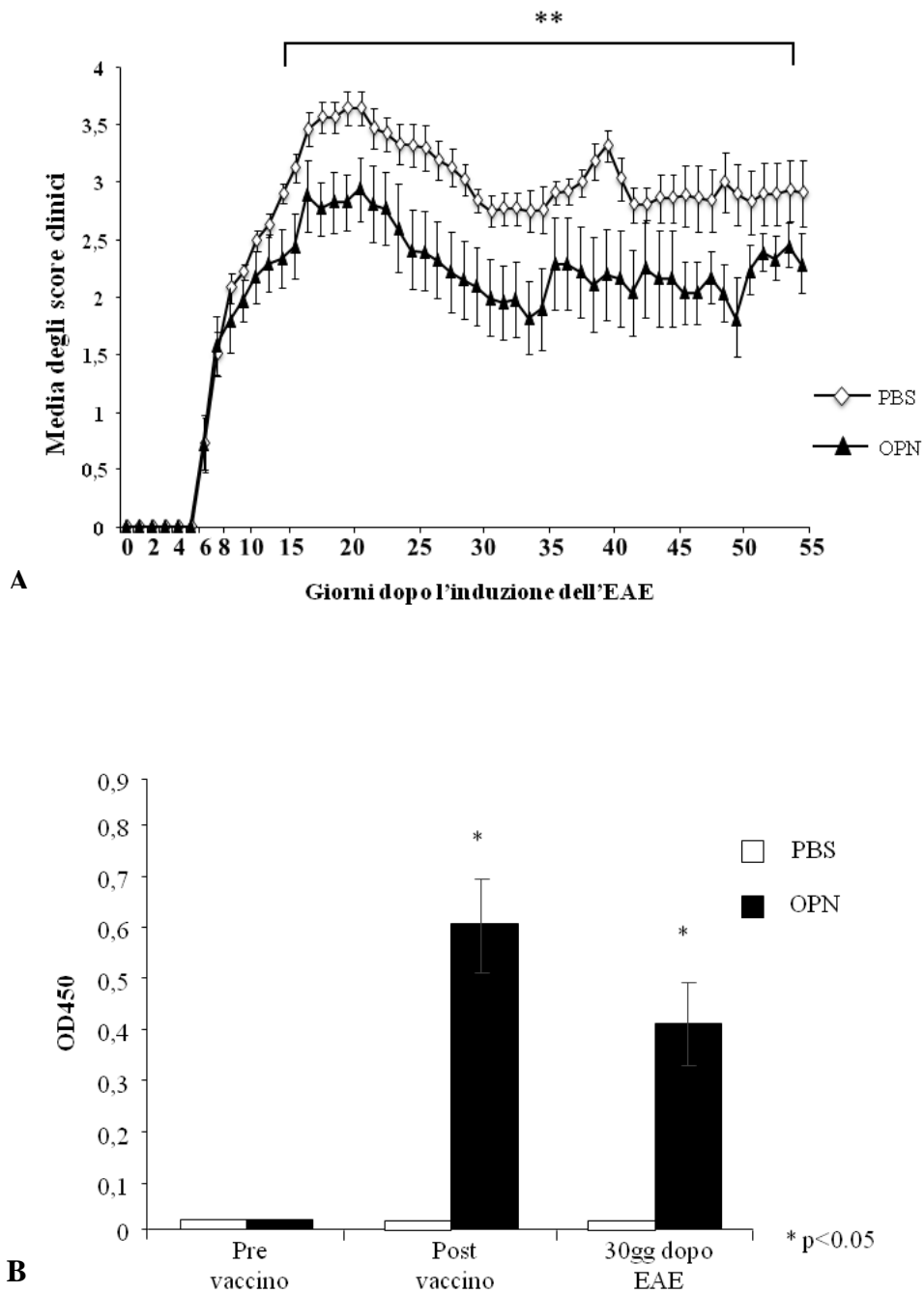


Figura 11. Effetti dell'immunizzazione attiva contro OPN. La vaccinazione è stata effettuata con OPN cross-linkata con OVA. (A) Score clinici degli animali immunizzati (in nero) e di controllo (in bianco,) espressi come media dei punteggi dei singoli topi \pm DS. (B) misurazione degli autoanticorpi anti OPN negli animali effettuata prima della vaccinazione, dopo le 4 settimane di vaccinazione (prima dell'induzione dell'EAE) o dopo 30 giorni dall'induzione dell'EAE. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney U-test.

6.6 Produzione di anticorpi anti-OPN

Le proteine ricombinanti da noi prodotte sono state utilizzate come esca nella ricerca di anticorpi specifici per il frammento N- o C-terminale, mediante la tecnica del phage-display. La strategia utilizzata ha previsto l'utilizzo di una libreria di scFv ovvero di frammenti anticorpali corrispondenti alle regioni VH e VL degli anticorpi. Una volta isolati i frammenti anticorpali di interesse possono essere ingegnerizzati al fine di aumentare la stabilità della molecola e migliorarne l'efficacia terapeutica.

Nel nostro caso con questo metodo sono stati identificati 2 frammenti anticorpali: 1 diretto contro la porzione N-terminale e 1 contro la porzione C-terminale di OPN. Le porzioni VH/VL identificate mediante phage-display sono state fuse alla sequenza che codifica per il CH2-CH3 delle IgG1 umane, mediante clonaggio nel vettore pHYGRO, ingegnerizzato dal laboratorio del Prof. Sblattero. I minibodies così prodotti sono stati clonati nel vettore pUCOE precedentemente descritto e trasfettati stabilmente in cellule CHO-s. Questo ha permesso, ancora una volta di ottimizzare la produzione della molecola corrispondente. La **figura 12** mostra l'analisi Western blot dei surnatanti di coltura di cellule che producono stabilmente ognuno di questi anticorpi, decorato con anticorpo anti-SV5.

Le rispettive cellule sono state coltivate in terreno sintetico e la proteina corrispondente purificata mediante cromatografia per affinità su colonna di proteina A. Anche in questo caso il prodotto della purificazione proteica è stato dializzato *overnight* contro PBS e controllato su gel di poliacrilammide colorato con blu di Coomassie. Il risultato, mostrato in **figura 13**, ha permesso di verificare la corretta concentrazione della preparazione proteica ottenuta, mediante il confronto con una curva di BSA a concentrazione nota, e di verificare l'assenza di proteine contaminanti o di bande di degradazione.

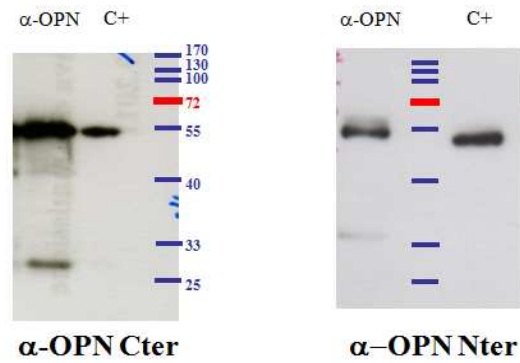


Figura 12. Western Blotting dei surnatanti di coltura di cellule CHO-s trasfettate stabilmente con i plasmidi che codificano per miniantibodies anti-OPN. Le sequenze VH/VL specifiche per ciascun frammento di OPN sono state clonate nel vettore pHYGRO e prodotte come miniantibodies nel surnatante di coltura di cellule CHO-s trasfettate stabilmente. La figura mostra il Western Blot decorato con anticorpo anti-SV5 corrispondente al minibody specifico per la porzione C-terminale di OPN (A) e per la porzione N-terminale (B)

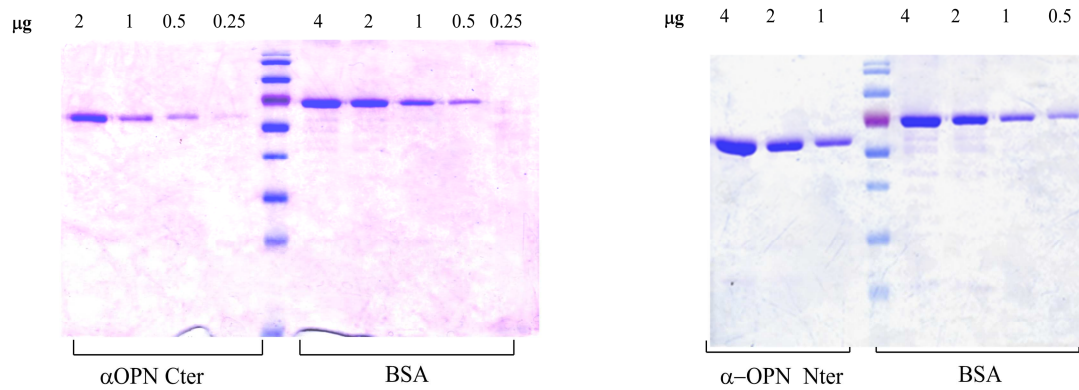


Figura 13. Quantificazione su gel di poliacrilammide colorato con Blu di Coomassie. I prodotti di purificazione di ciascun miniantibody sono stati valutati su gel di Coomassie per stabilirne la corretta concentrazione e l'assenza di contaminanti.

6.7 Riconoscimento di OPN da parte degli anticorpi anti-OPN

Gli anticorpi prodotti sono stati saggiati per la capacità di riconoscere le diverse porzioni di OPN e la molecola intera, mediante test ELISA indiretto, in cui l'antigene è stato adsorbito sul fondo della piastra e il legame del miniantibody è stato visualizzato mediante l'aggiunta di un anticorpo capace di riconoscere il Fc coniugato ad HRP. La **figura 14** mostra il risultato ottenuto espresso come valore di assorbanza a 450 nm. Come mostrato, l'anticorpo selezionato contro la porzione C-terminale riconosce questo frammento e la molecola intera, mentre non dà alcun segnale in presenza della sola porzione N-terminale della molecola. Al contrario l'anticorpo selezionato contro la porzione N-terminale, riconosce questa porzione, ma solo in maniera ridotta la molecola intera. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che il dominio riconosciuto dall'anticorpo sia mascherato nella molecola intera dalla presenza del dominio C-terminale. Inoltre questo anticorpo mostra un certo grado di legame anche per la sola porzione C-terminale di OPN.

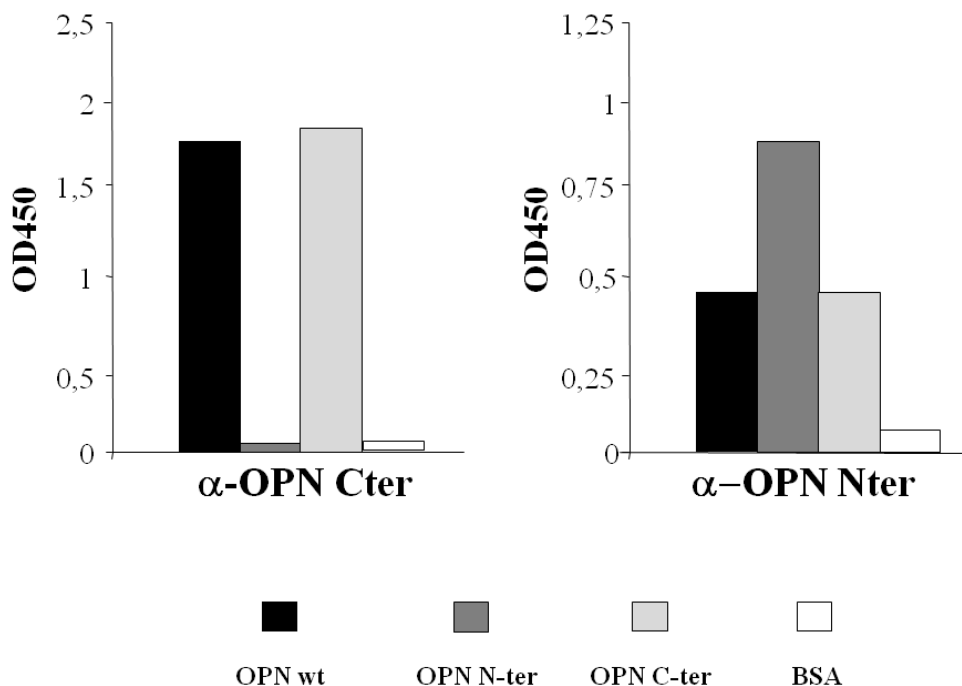


Figura 14. ELISA con minibodies anti-OPN. I minibodies sono stati testati per la capacità di riconoscimento di 2 μ g/ml di ciascuna molecola ricombinante di OPN. Il legame è stato visualizzato mediante l'ausilio di un anti-Human coniugato con HRP.

6.8 Valutazione della azione bloccante OPN degli anticorpi

Il saggio di protezione dalla morte cellulare è stato utilizzato per verificare l'abilità del minibody anti-OPN C-terminale di inibire la capacità di OPN di proteggere i linfociti T attivati dalla morte cellulare indotta da attivazione. Come mostrato in **figura 15** la percentuale di sopravvivenza delle cellule stimulate in presenza di rhOPN e contemporaneamente dell'anti-OPN C-terminale è del tutto paragonabile a quella delle cellule stimulate in presenza del solo anti-CD3. Questo risultato indica che tale anticorpo è in grado di inibire totalmente gli effetti anti-apoptotici di OPN.

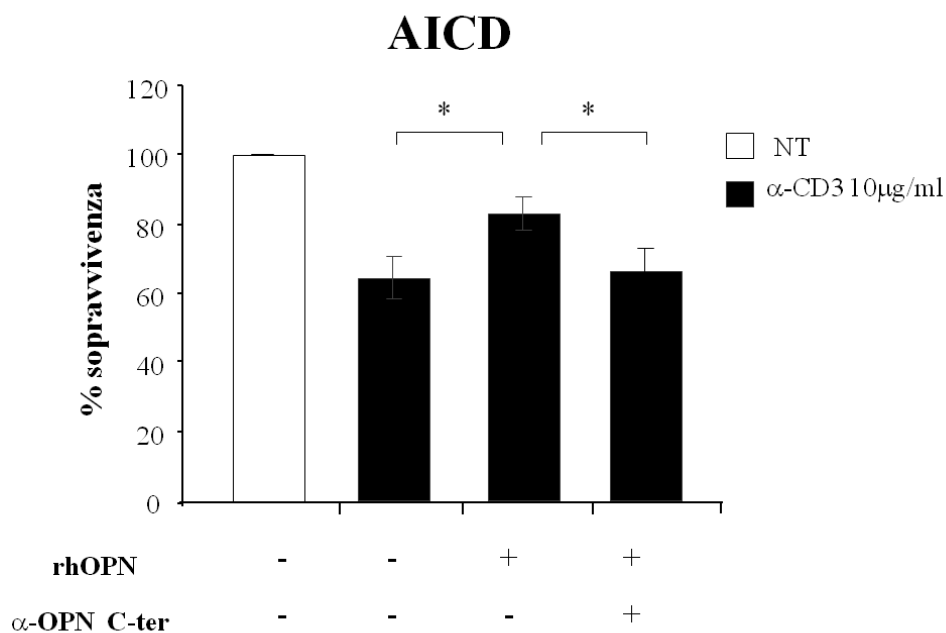


Figura 15. Effetti dell'anti-OPN C-ter sulla sopravvivenza dei linfociti T. I linfociti T sono stati stimolati con anti-CD3 (10 µg/ml) per indurre attivazione in presenza o in assenza 1µg/ml di OPN commerciale e/o di 10µg/ml dell'anti-OPN. I risultati sono espressi come % di sopravvivenza cellulare. Nel grafico sono rappresentate la media ± l'errore standard di 5 esperimenti indipendenti. * $p < 0,05$ rispetto alla condizione con rhOPN utilizzando il test di Wilcoxon.

6.9 Effetti dell'immunizzazione passiva contro OPN

Il minibody diretto verso la porzione C-terminale di OPN ha mostrato cross-reattività anche per le proteine murine. Data la sua capacità di inibire *in vitro* l'abilità anti apoptotica di OPN questo minibody è stato utilizzato in un protocollo di immunizzazione passiva eseguito iniettando 50µg della molecola in PBS il quinto, settimo e nono giorno dopo l'induzione della malattia, prima della comparsa dei sintomi neurologici. Come mostrato in **figura 16** i risultati sono stati subito molto

promettenti dal momento che gli animali immunizzati presentavano un andamento della malattia significativamente migliore rispetto agli animali trattati con immunoglobuline di controllo ($p < 0.05$). Tuttavia questi effetti sono scomparsi dopo pochi giorni a causa della comparsa di una risposta anti farmaco, ovvero di anticorpi anti-anticorpo (**figura 17**). Infatti la molecola somministrata presenta la porzione costante delle immunoglobuline umane e pertanto risulta capace di stimolare il sistema immunitario di topo. Nonostante questo però abbiamo voluto ripetere la somministrazione della molecola anche dopo la comparsa dei sintomi al fine di valutare le potenzialità di tale anticorpo in un protocollo di immunizzazione terapeutica. Gli score di malattia dei topi immunizzati con l'anti-OPN sono stati, nei giorni immediatamente successivi al trattamento, significativamente inferiori rispetto a quelli degli animali di controllo ($p < 0.05$) evidenziando la capacità della molecola di revertire l'andamento della malattia. Anche in questo caso però gli effetti non sono stati duraturi nel tempo a causa dell'immunogenicità della molecola.

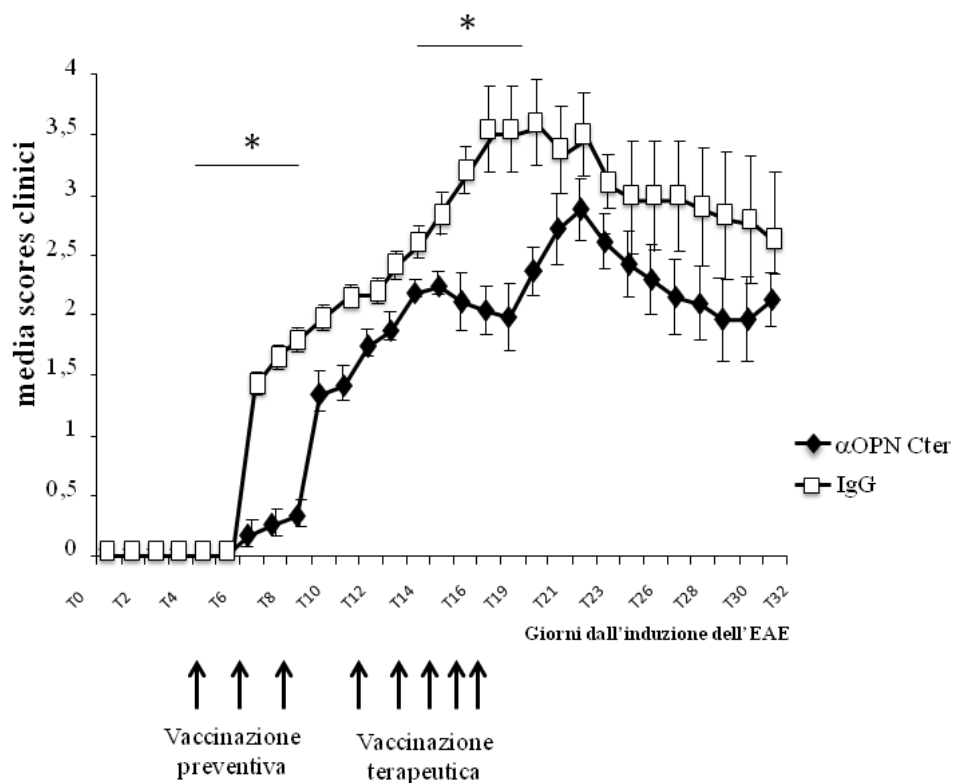


Figura 16. Effetti dell'immunizzazione passiva contro OPN. Gli score clinici degli animali immunizzati (in nero) e di controllo (in bianco,) sono stati misurati giornalmente e sono espressi come media dei punteggi dei singoli topi $\pm DS$. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney.

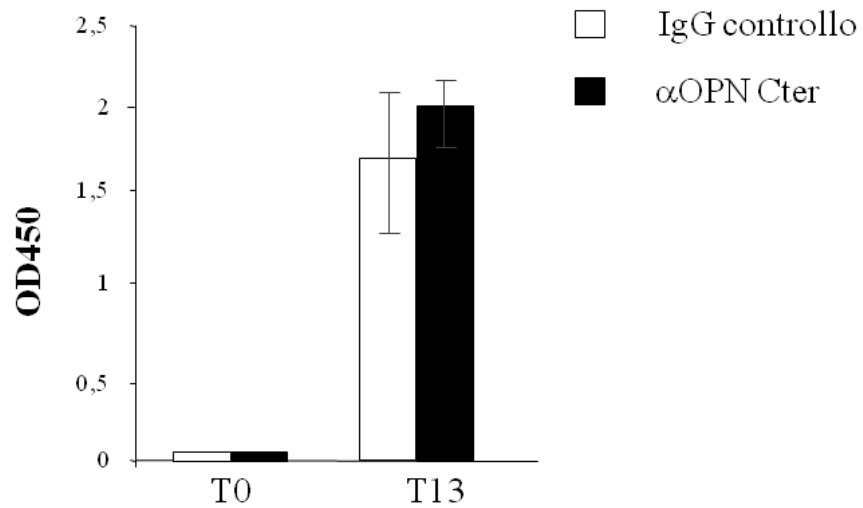


Figura 17. Analisi della risposta anti farmaco. I sieri degli animali immunizzati sono stati testati per la presenza di anticorpi diretti verso il minibody anti-OPN, prima del trattamento (T0) e alla scomparsa degli effetti clinici (T13). Le barre nere si riferiscono al siero degli animali immunizzati con il minibody, mentre le barre bianche agli animali trattati con IgG di controllo. I risultati sono espressi come media dell'assorbanza ottenuta \pm DS.

7. DISCUSSIONE

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria e demielinizzante del sistema nervoso centrale (SNC), mediata da una risposta autoimmune dei linfociti T helper proinfiammatori (Th1 e Th17) e dei linfociti T citotossici (CTL) contro antigeni della guaina mielinica.

Diversi studi indicano che un ruolo nella patogenesi della malattia è giocato da OPN. I livelli di OPN sono significativamente elevati nel siero e nel plasma dei pazienti con SM e questa citochina sembrerebbe essere implicata nelle ricadute neurologiche della forma RR della malattia. Evidenze del ruolo patogenetico di OPN nella SM derivano anche da studi effettuati nel modello murino della malattia, l'Encefalomielite Autoimmune Sperimentale (EAE). È stato infatti dimostrato che topi privi di OPN sviluppano un quadro EAE meno severo rispetto ai topi normali e la somministrazione di rOPN a tali topi induce una ricaduta immediata con successiva evoluzione verso la forma progressiva e la morte.

OPN è prodotta ad alti livelli nella matrice extracellulare della barriera ematoencefalica, dove potrebbe giocare un ruolo nel reclutamento dei linfociti nei tessuti cerebrali infiammati. Inoltre OPN esplica il suo ruolo patogenetico sostenendo l'infiammazione e inducendo stimoli proliferativi e antiapoptotici nei linfociti autoreattivi.

Gli effetti patogenetici di OPN dipendono dalla capacità della molecola di interagire con diversi ligandi; questa capacità è a sua volta legata alle modificazioni post-traduzionali cui OPN può essere soggetta. Il taglio proteolitico operato sulla molecola dalla Trombina è di particolare interesse perché permette l'interazione con l'integrina $\alpha4\beta1$. Questa integrina è coinvolta nella migrazione dei linfociti nel SNC ed è il bersaglio del farmaco Natalizumab, un anticorpo monoclonale umanizzato il cui utilizzo ha mostrato una riduzione dei sintomi e delle lesioni cerebrali nei due terzi dei pazienti trattati.

Il taglio della Trombina determina la formazione di due frammenti di OPN: N- e C-terminale. Il frammento N-terminale è coinvolto nell'interazione con diverse integrine, e presenta due siti critici di interazione con l'integrina $\alpha4\beta1$. Il frammento C-terminale è responsabile dell'interazione con alcune isoforme del recettore CD44.

Il ruolo patogenetico di tali frammenti nella SM è, ad oggi, poco chiarito e potrebbe essere cruciale per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici. Le conoscenze del loro ruolo ad oggi disponibili sono solo parziali e derivano per lo più da studi di inibizione *in vitro* dei singoli recettori di OPN.

Al fine di studiare l'attività dei due frammenti di OPN *in vivo* (nel topo) e *in vitro* (nel topo e nell'uomo) abbiamo deciso di produrre costrutti ricombinanti della proteina full-length umana e murina, e dei rispettivi frammenti N- e C-terminale. Inoltre, sia per la OPN umana che per quella

murina, è stato generato un quarto mutante corrispondente alla proteina full-length mutata nel sito di taglio della Trombina e quindi incapace di generare i due frammenti e di legare l'integrina $\alpha 4\beta 1$. Tutte le proteine ricombinanti sono state prodotte in un sistema di espressione eucariotico che ha consentito di ottenere proteine con le corrette modificazioni post-traduzionali. Inoltre il sistema di produzione proteica è stato ottimizzato al fine di massimizzarne la resa. Questo obiettivo è stato raggiunto da un lato agendo sulla quantità della proteina prodotta dal clone cellulare, e dall'altro agendo sulle condizioni di coltura delle cellule trasfettate stabilmente.

Al fine di aumentare la produzione delle molecole ricombinanti, il cDNA ad esse corrispondente è stato clonato nel vettore di espressione eucariotico pUCOE-MB, ingegnerizzato dal gruppo di lavoro del Prof. Sblattero. Questo vettore si basa sull'utilizzo degli elementi di espressione UCOE (*ubiquitously-acting chromatin opening elements*) che sono isole CpG non metilabili presenti nel promotore di geni housekeeping che fanno sì che la cromatina intorno al transgene integrato sia in uno stato conformazionale aperto e quindi sia trascrizionalmente attiva. L'utilizzo di questi elementi permette quindi di massimizzare la trascrizione genica, e di conseguenza la traduzione proteica, in maniera indipendente dalla posizione del transgene sul cromosoma.

I plasmidi ricombinanti corrispondenti sono stati trasfettati in cellule CHO-s coltivate in terreno sintetico in un sistema innovativo di coltura cellulare, con il nome di CELLLine™, che permette di ottenere concentrazioni di proteine ricombinanti 50-100 volte più alte rispetto al mantenimento in coltura tradizionale.

Le molecole ricombinanti sono state riconosciute non solo da anticorpi anti istidina ma anche da anticorpi specifici per ciascun frammento di OPN. Esse sono state purificate mediante cromatografia per affinità su colonna al Nichel e quantizzate mediante densitometria sulla base di una curva di BSA a concentrazione nota. La digestione enzimatica con Trombina delle molecole ricombinanti intere ha dimostrato che le mutazioni inserite nel cDNA di OPN rendono la molecola capace di resistere all'azione proteolitica della trombina.

Saggi di stimolazione *in vitro* ci hanno permesso di verificare che le molecole prodotte sono dotate di funzionalità biologica. In particolare in tutti i saggi effettuati gli effetti della molecola ricombinante home made corrispondente a OPN intera sono stati del tutto sovrapponibili a quelli ottenuti dalla molecola ricombinante commerciale. I risultati ottenuti si aggiungono ai dati già presenti in letteratura suggerendo che OPN giochi un ruolo importante nell'insorgenza e nella progressione dell'autoimmunità, sia attraverso l'inibizione dell'apoptosi linfocitaria che attraverso la secrezione di citochine pro-infiammatorie di tipo Th1 e Th17.

Inoltre gli esperimenti *in vitro* condotti sono stati finalizzati ad effettuare uno studio sistematico degli effetti dei due frammenti generati dal taglio della trombina, il cui ruolo relativo non è ancora

pienamente conosciuto. Le conoscenze fino ad ora ottenute, presenti in letteratura, sono state per lo più ricavate in maniera indiretta attraverso il blocco dei singoli recettori di OPN; al contrario l'approccio qui utilizzato è stato finalizzato a valutare in maniera diretta e più completa gli effetti di ciascuno dei due frammenti. I risultati ottenuti supportano l'idea che durante l'infiammazione, l'attivazione della trombina e il conseguente taglio di OPN determini la formazione di frammenti con ruoli parzialmente diversi rispetto alla molecola intera. A sostegno dell'idea che l'attivazione della trombina giochi un ruolo nella patogenesi della malattia è interessante ricordare che l'inibizione di questo enzima *in vivo* (attraverso la somministrazione dell'inibitore irudina) si è dimostrata capace di revertire i sintomi clinici della malattia nel topo [64;81].

I risultati ottenuti dimostrano che la produzione di IL-17 è prevalentemente legata alla porzione N-terminale di OPN, i cui effetti sono maggiori di quelli ottenuti con la molecola intera. La porzione C-terminale non è stata in grado di indurre un incremento significativo di questa citochina. L'IL-17 è una citochina pro-infiammatoria con funzioni anti-apoptotiche, che esercita un ruolo chiave nella patogenesi della SM. Per questo motivo questi risultati suggeriscono che l'utilizzo di un anticorpo neutralizzante la porzione N-terminale potrebbe rappresentare un utile strumento terapeutico per inibire la secrezione di IL-17 e migliorare il decorso della SM.

Dall'altro lato i risultati ottenuti suggeriscono che anche il frammento C-terminale possa giocare un ruolo patogenetico. Esso ha mostrato effetti anti-apoptotici e capacità di indurre secrezione di IFN- γ . Inoltre si è dimostrato in grado di indurre -in misura maggiore rispetto al frammento N-terminale- la secrezione di TIMP-1, un inibitore delle metalloproteasi. Negli anni passati il nostro laboratorio ha dimostrato che TIMP-1 inibisce, *in vitro*, sia l'AICD che la morte indotta da Fas dei linfociti T. Studi ulteriori dovranno essere effettuati per caratterizzare meglio la funzione di queste molecole attraverso l'utilizzo *in vivo* delle proteine murine. Ciononostante si può affermare che i due frammenti di OPN si presentano come potenziali target per la messa a punto di nuove strategie terapeutiche per la Sclerosi Multipla o altre malattie autoimmuni in cui essa è coinvolta.

Diversi studi hanno recentemente evidenziato che l'immunizzazione contro citochine pro-infiammatorie è efficace nel trattamento delle malattie autoimmuni [73; 78-81]. Questi studi si basano sull'evidenza che anticorpi diretti verso citochine proinfiammatorie sono fisiologicamente prodotti durante la risposta autoimmune e possono far parte del meccanismo volto a ridurre l'infiammazione [2]. Dal momento che OPN è una citochina chiave nella patogenesi della SM ci siamo chiesti se autoanticorpi contro OPN siano presenti nel siero di pazienti con questa malattia. La ricerca di tali auto-anticorpi è stata effettuata utilizzando un saggio ELISA indiretto da noi messo a punto, la cui realizzazione ci ha permesso di superare il limite della mancanza di kit

commerciali. La realizzazione di questo test ha sfruttato la disponibilità delle proteine ricombinanti di OPN da noi prodotte. Inoltre un anticorpo anti OPN isolato e prodotto in collaborazione con il laboratorio del Prof. Sblattero è stato utilizzato come calibratore interno del saggio.

Questo approccio ci ha permesso di identificare la presenza di anticorpi anti OPN e di rilevare che essi sono significativamente aumentati nei pazienti con SM rispetto ai controlli sani. Inoltre stratificando i pazienti in base alla forma clinica della malattia è stato possibile evidenziare che i più alti livelli di autoanticorpi anti-OPN correlano con le forme progressive o con la malattia in fase attiva. L'identificazione di anticorpi anti-OPN nella SM è un risultato molto innovativo dal momento che non ha precedenti in letteratura. Infatti autoanticorpi anti OPN sono stati trovati, nell'uomo, solo in pazienti con Artrite Reumatoide e Osteoartrite, ma il loro ruolo nella patogenesi di queste malattie non è stato chiarito. I risultati ottenuti in questa tesi suggeriscono che OPN e anticorpi anti-OPN possano giocare ruoli opposti nella patogenesi della SM. Infatti

La presenza di questi autoanticorpi nei controlli sani è confortante circa la loro non tossicità e il loro possibile uso *in vivo* per antagonizzare gli effetti patogenetici di OPN. A tale proposito è interessante notare che dati di letteratura indicano come l'immunizzazione del topo con un plasmide codificante per OPN aumenti la produzione di anticorpi contro OPN e migliori il decorso cronico dell'EAE se somministrato prima dell'induzione della malattia [72]. Questi studi indirizzano verso la messa a punto di protocolli di immunizzazione contro OPN per il trattamento della SM. Con queste premesse abbiamo voluto mettere a punto un protocollo di immunizzazione attiva finalizzata a sostenere la produzione di autoanticorpi anti-OPN educando il sistema immunitario a produrre anticorpi neutralizzanti la molecola.

Dal momento che i vaccini a DNA sollevano dubbi circa la loro sicurezza per la salute la valutazione dell'efficacia di una immunizzazione attiva contro OPN è stata eseguita mediante un protocollo di immunizzazione effettuato utilizzando la OPN ricombinante murina da noi prodotta, la cui immunogenicità è stata aumentata attraverso il legame all'ovalbumina. La vaccinazione contro OPN è stata effettuata prima della comparsa dei sintomi e si è dimostrata in grado di indurre la produzione di un elevato titolo di autoanticorpi diretti verso questa citochina. La presenza di tali anticorpi si accompagna alla diminuzione degli score di malattia degli animali trattati rispetto ai controlli indicando la capacità di tali anticorpi di contrastare gli effetti patogenetici di OPN. La vaccinazione si è dimostrata in grado di indurre una risposta efficace e duratura, come dimostrato dal fatto che sia gli effetti clinici sia la presenza di autoanticorpi nel siero, permangono nel tempo. Studi ulteriori saranno eseguiti per valutare l'efficacia di una vaccinazione terapeutica. Inoltre, poiché i due frammenti N- e C-terminale potrebbero giocare ruoli parzialmente diversi nella

patogenesi della SM ci proponiamo di valutare gli effetti di una vaccinazione diretta verso ciascuno di essi.

Il fatto che i diversi pazienti analizzati siano eterogenei dal punto di vista degli anticorpi prodotti indirizza ad approfondire la possibilità di una strategia di immunizzazione passiva personalizzata. Anticorpi ricombinanti umani sono comunemente isolati nei laboratori di ricerca utilizzando la tecnologia del phage display. Questo è un metodo *in vitro* per selezionare anticorpi, che si basa sulla creazione di librerie di anticorpi di grandi dimensioni, dai quali gli anticorpi monoclonali di interesse possono essere selezionati sfruttando la loro capacità di legame all'antigene. Negli ultimi anni librerie fagiche anticorpali sono state utilizzate per selezionare anticorpi umani specifici ad alta affinità contro un certo numero di antigeni tumorali, con elevato potenziale sia diagnostico che terapeutico. Uno dei vantaggi offerti da questa tecnica è dato dal fatto che i frammenti anticorpali, isolati contemporaneamente alla selezione, possono essere successivamente ingegnerizzati per ottimizzarne diverse caratteristiche, tra cui farmacocinetica, immunogenicità, attività di legame, funzioni effettrici.

Questo approccio ci ha permesso di isolare i scFv corrispondenti a due anticorpi anti-OPN e di produrli come proteine di fusione con la regione Fc delle IgG1 umane per formare "minibodies". Di essi, uno è diretto verso la porzione C-terminale di OPN, l'altro è stato selezionato per la sua capacità di interagire con la porzione N-terminale ma ha mostrato una seppur minima cross-reattività per la porzione C-terminale della molecola.

I minibodies prodotti si offrono come possibili strumenti atti ad antagonizzare gli effetti pro-infiammatori e/o antiapoptotici di OPN. In particolare l'anticorpo diretto verso la porzione C-terminale della molecola si è dimostrato in grado di annullare la capacità di OPN di ridurre la morte cellulare indotta da attivazione. La capacità mostrata da questo anticorpo di riconoscere la corrispondente molecola murina lo ha reso inoltre un potenziale strumento per l'allestimento di studi ulteriori *in vivo* nel modello murino della EAE, finalizzati a mettere a punto un protocollo di immunizzazione passiva contro OPN. E esso si è dimostrato in grado di migliorare in maniera significativa il decorso della malattia rispetto al trattamento con il controllo isotipico, in un protocollo di immunizzazione sia preventiva che terapeutica. Tuttavia gli effetti della molecola, sebbene molto entusiasmanti, sono stati subito contrastati dalla comparsa di una risposta anti farmaco. È importante, a tale proposito, ricordare che la molecola è interamente umana e quindi in grado di indurre una risposta da parte del sistema immunitario murino. La produzione di un anticorpo costituito dalla porzione variabile di tale anti-OPN fusa al Fc delle immunoglobuline murine permetterà nel prossimo futuro di ampliare questi studi.

In conclusione questo lavoro ha previsto l'impiego di un approccio biotecnologico che ha permesso di indagare e approfondire il ruolo di OPN e dei due frammenti generati dal taglio della trombina nella insorgenza della malattia autoimmune. Inoltre i risultati mostrati hanno permesso di dimostrare per la prima volta la presenza di autoanticorpi anti-OPN nel siero dei pazienti con SM, e di suggerire che essi siano finalizzati a contrastare gli effetti patogenetici della molecola. Questo risultato indirizza verso la ricerca di strategie terapeutiche volte a sostenere il titolo di tali anticorpi, che si presentano quindi come un utile strumento per il trattamento della malattia. In particolare sia la vaccinazione attiva che l'immunizzazione passiva contro OPN potrebbero in un futuro prossimo, rappresentare una nuova strategia terapeutica per la SM.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Goldsby R., A., Kindt T., J., Osborne B., A. (2005) *Kuby 2/e*, 473-521
2. de Lemos Rieper C, Galle P, Hansen MB. Characterization and potential clinical applications of autoantibodies against cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 Feb;20(1):61-75.
3. Lassmann H. Mechanisms of demyelination and tissue destruction in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg.* 2002 Jul;104(3):168-71. Review.
4. Cannella B, Raine CS. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 1995 Apr;37(4):424-35.
5. Hauser SL, Fleischnick E, Weiner HL, Marcus D, Awdeh Z, Yunis EJ, Alper CA. Extended major histocompatibility complex haplotypes in patients with multiple sclerosis. (1989) *Neurology* **39**, 275-7
6. Burnham JA, Wright RR, Dreisbach J, Murray RS. The effect of high-dose steroids on MRI gadolinium enhancement in acute demyelinating lesions. (1991) *Neurology* **41**, 1349-54
7. Stone LA, Frank JA, Albert PS, Bash C, Smith ME, Maloni H, McFarland HF. The effect of interferon-beta on blood-brain barrier disruptions demonstrated by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in relapsing-remitting multiple sclerosis. (1995) *Annals of Neurology* **37**, 611-9
8. Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol.* 2006 Nov;180(1-2):17-28.
9. Swanborg RH. Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995 Oct;77(1):4-13.
10. Fritz RB, McFarlin DE. Encephalitogenic epitopes of myelin basic protein. *Chem Immunol.* 1989;46:101-25.
11. Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, Ellwart JW, Willem M, Lassmann H, Wekerle H. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity.* 2001 May;14(5):547-60.
12. Owens T, Wekerle H, Antel J. Genetic models for CNS inflammation. *Nat Med.* 2001 Feb;7(2):161-6.
13. Steinman L. Some misconceptions about understanding autoimmunity through experiments with knockouts. *J Exp Med.* 1997 Jun 16;185(12):2039-41.
14. Hohlfeld R, Wiendl H. The ups and downs of multiple sclerosis therapeutics. *Ann Neurol.* 2001 Mar;49(3):281-4.
15. Martin R, Stürzebecher CS, McFarland HF. Immunotherapy of multiple sclerosis: where are we? Where should we go? *Nat Immunol.* 2001 Sep;2(9):785-8.

16. Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell*. 1996 May 3;85(3):299-302.
17. Weiner HL. Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease. *Arch Neurol*. 2004 Oct;61(10):1613-5.
18. Bar-Or A, Oliveira EM, Anderson DE, Hafler DA. Molecular pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1999 Dec;100(1-2):252-9.
19. Lassmann H, Ransohoff RM. The CD4-Th1 model for multiple sclerosis: a critical[correction of crucial] re-appraisal. *Trends Immunol*. 2004 Mar;25(3):132-7.
20. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain*. 2000 Jun;123:1174-83.
21. Johnson AJ, Suidan GL, McDole J, Pirko I. The CD8 T cell in multiple sclerosis: suppressor cell or mediator of neuropathology? *Int Rev Neurobiol*. 2007;79:73-97.
22. 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 May;107(9):1055-61. Review.
23. Gravalles EM. Osteopontin: a bridge between bone and the immune system. *J Clin Invest*. 2003 Jul;112(2):147-9. Review. Erratum in: *J Clin Invest*. 2003 Aug;112(4):627.
24. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J. Osteopontin--a molecule for all seasons. *QJM*. 2002 Jan;95(1):3-13.
25. Naldini A, Leali D, Pucci A, Morena E, Carraro F, Nico B, Ribatti D, Presta M. Cutting edge: IL-1beta mediates the proangiogenic activity of osteopontin-activated human monocytes. *J Immunol*. 2006 Oct 1;177(7):4267-70.
26. 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 Oct;21(10):475-8.
27. Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp Oncol*. 2004 Sep;26(3):179-84.
28. Prince CW, Oosawa T, Butler WT, Tomana M, Bhowm AS, Bhowm M, Schrohenloher RE. Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J Biol Chem*. 1987 Feb 25;262(6):2900-7.
29. Senger DR. Molecular framework for angiogenesis: a complex web of interactions between extravasated plasma proteins and endothelial cell proteins induced by angiogenic cytokines. *Am J Pathol*. 1996 Jul;149(1):1-7.
30. Mitsiades N, Yu WH, Poulaki V, Tsokos M, Stamenkovic I. Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res*. 2001 Jan 15;61(2):577-81.
31. O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol*. 2000 Dec;81(6):373-90.

32. Carecchio M, Comi C. The role of osteopontin in neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis.* 2011;25(2):179-85.
33. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, Cantor H. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science.* 2000 Feb 4;287(5454):860-4.
34. Young MF, Kerr JM, Termine JD, Wewer UM, Wang MG, McBride OW, Fisher LW. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics.* 1990 Aug;7(4):491-502.
35. Giacomelli F, Marciano R, Pistorio A, Catarsi P, Canini S, Karsenty G, Ravazzolo R. Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity. *Physiol Genomics.* 2004 Dec 15;20(1):87-96.
36. Shinohara ML, Kim HJ, Kim JH, Garcia VA, Cantor H. Alternative translation of osteopontin generates intracellular and secreted isoforms that mediate distinct biological activities in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 May 20;105(20):7235-9.
37. 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 Jul 18;29(1):68-78.
38. Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:723-49.
39. O'Regan AW, Chupp GL, Lowry JA, Goetschkes M, Mulligan N, Berman JS. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol.* 1999 Jan 15;162(2):1024-31.
40. Rollo EE, Denhardt DT. Differential effects of osteopontin on the cytotoxic activity of macrophages from young and old mice. *Immunology.* 1996 Aug;88(4):642-7.
41. Lin YH, Yang-Yen HF. The osteopontin-CD44 survival signal involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Biol Chem.* 2001 Dec 7;276(49):46024-30.
42. O'Regan AW, Hayden JM, 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. *J Leukoc Biol.* 2000 Oct;68(4):495-502.
43. 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 Mar 28;27(13):3603-11.
44. O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol.* 2000 Dec;81(6):373-90.
45. Hur EM, Youssef S, Haws ME, Zhang SY, Sobel RA, Steinman L. Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nat Immunol.* 2007 Jan;8(1):74-83.

46. Stromnes IM, Goverman JM. Osteopontin-induced survival of T cells. *Nat Immunol.* 2007 Jan;8(1):19-20.
47. Guo H, Cai CQ, Schroeder RA, Kuo PC. Osteopontin is a negative feedback regulator of nitric oxide synthesis in murine macrophages. *J Immunol.* 2001 Jan 15;166(2):1079-86.
48. Takahashi F, Takahashi K, Maeda K, Tominaga S, Fukuchi Y. Osteopontin is induced by nitric oxide in RAW 264.7 cells. *IUBMB Life.* 2000 Mar;49(3):217-21.
49. Xanthou G, Alissafi T, Semitekolou M, Simoes DC, Economidou E, Gaga M, Lambrecht BN, Lloyd CM, Panoutsakopoulou V. Osteopontin has a crucial role in allergic airway disease through regulation of dendritic cell subsets. *Nat Med.* 2007 May;13(5):570-8.
50. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol.* 2006 Feb;16(2):79-87.
51. Rittling SR, Chambers AF. Role of osteopontin in tumour progression. *Br J Cancer.* 2004 May 17;90(10):1877-81.
52. Wai PY, Mi Z, Guo H, Sarraf-Yazdi S, Gao C, Wei J, Marroquin CE, Clary B, Kuo PC. Osteopontin silencing by small interfering RNA suppresses in vitro and in vivo CT26 murine colon adenocarcinoma metastasis. *Carcinogenesis.* 2005 Apr;26(4):741-51.
53. Masutani K, Akahoshi M, Tsuruya K, Tokumoto M, Ninomiya T, Kohsaka T, Fukuda K, Kanai H, Nakashima H, Otsuka T, Hirakata H. Predominance of Th1 immune response in diffuse proliferative lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2001 Sep;44(9):2097-106.
54. Blom T, Franzén A, Heinegård D, Holmdahl R. Comment on "The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease". *Science.* 2003 Mar 21;299(5614):1845;
55. Zhao C, Fancy SP, French-Constant C, Franklin RJ. Osteopontin is extensively expressed by macrophages following CNS demyelination but has a redundant role in remyelination. *Neurobiol Dis.* 2008 Aug;31(2):209-17.
56. Mishima R, Takeshima F, Sawai T, Ohba K, Ohnita K, Isomoto H, Omagari K, Mizuta Y, Ozono Y, Kohno S. High plasma osteopontin levels in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol.* 2007 Feb;41(2):167-72.
57. Brucklacher-Waldert V, Stuermer K, Kolster M, Wolthausen J, Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain.* 2009 Dec;132(Pt 12):3329-41.
58. Kwan BC, Tam LS, Lai KB, Lai FM, Li EK, Wang G, Chow KM, Li PK, Szeto CC. The gene expression of type 17 T-helper cell-related cytokines in the urinary sediment of patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2009 Dec;48(12):1491-7.
59. Gaffen SL. The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2009 Oct;11(5):365-70.
60. Diveu C, McGeachy MJ, Boniface K, Stumhofer JS, Sathe M, Joyce-Shaikh B, Chen Y, Tato CM, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Hunter CA, Cua DJ, Kastelein RA. IL-27

- blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J Immunol.* 2009 May 1;182(9):5748-56.
61. Chabas D. [Osteopontin, a multi-faceted molecule]. *Med Sci (Paris).* 2005 Oct;21(10):832-8.
 62. Chiocchetti A, Comi C, Indelicato M, Castelli L, Mesturini R, Bensi T, Mazzarino MC, Giordano M, D'Alfonso S, Momigliano-Richiardi P, Liguori M, Zorzon M, Amoroso A, Trojano M, Monaco F, Leone M, Magnani C, Dianzani U. Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *J Neuroimmunol.* 2005 Jun;163(1-2):172-8.
 63. D'Alfonso S, Barizzone N, Giordano M, Chiocchetti A, Magnani C, Castelli L, Indelicato M, Giacobelli 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 Feb;52(2):539-47.
 64. Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, Sobel RA, Lock C, Karpuz M, Pedotti R, Heller R, Oksenberg JR, Steinman L. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science.* 2001 Nov 23;294(5547):1731-5
 65. Vogt MH, Lopatinskaya L, Smits M, Polman CH, Nagelkerken L. Elevated osteopontin levels in active relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2003 Jun;53(6):819-22.
 66. Steinman L. A molecular trio in relapse and remission in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2009 Jun;9(6):440-7.
 67. Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Jan 19;280(2):460-5.
 68. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature.* 1992 Mar 5;356(6364):63-6.
 69. Steinman L. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov.* 2005 Jun;4(6):510-8.
 70. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW; AFFIRM Investigators. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2006 Mar 2;354(9):899-910.
 71. Rudick RA, Stuart WH, Calabresi PA, Confavreux C, Galetta SL, Radue EW, Lublin FD, Weinstock-Guttman B, Wynn DR, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW; SENTINEL Investigators. Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2006 Mar 2;354(9):911-23.

72. Steinman L, *et al.* *Response to Comment on "The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease"*. *Science* 2003 299;1845(b)
73. Steinman L. Inverse vaccination, the opposite of Jenner's concept, for therapy of autoimmunity. *J Intern Med.* 2010 May;267(5):441-51.
74. Ross C, Hansen MB, Schyberg T, Berg K. Autoantibodies to crude human leucocyte interferon (IFN), native human IFN, recombinant human IFN-alpha 2b and human IFN-gamma in healthy blood donors. *Clin Exp Immunol.* 1990 Oct;82(1):57-62.
75. Svenson M, Hansen MB, Ross C, Diamant M, Rieneck K, Nielsen H, Bendtzen K. Antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a dominant anti-cytokine activity in human IgG preparations. *Blood.* 1998 Mar 15;91(6):2054-61.
76. Caruso A, Turano A. Natural antibodies to interferon-g. *Biotherapy.* 1997;10(1):29-37.
77. Theofilopoulos AN. The basis of autoimmunity: Part I. Mechanisms of aberrant self-recognition. *Immunol Today.* 1995 Feb;16(2):90-8.
78. Bossù P, Neumann D, Del Giudice E, Ciaramella A, Gloaguen I, Fantuzzi G, Dinarello CA, Di Carlo E, Musiani P, Meroni PL, Caselli G, Ruggiero P, Boraschi D. IL-18 cDNA vaccination protects mice from spontaneous lupus-like autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Nov 25;100(24):14181-6.
79. Shen Y, Chen J, Zhang X, Wu X, Xu Q. Human TNF-alpha gene vaccination prevents collagen-induced arthritis in mice. *Int Immunopharmacol* 2007; 7: 1140-1149.
80. Uyttenhove C, Van Snick J. Anti-cytokine autovaccinations as tools for the analysis of cytokine function in vivo. *Cytokine Growth Factor Rev* 2012; 23: 1-6.
81. Jansson M, Panoutsakopoulou V, Baker J, Klein L, Cantor H. Cutting edge: Attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in eta-1/osteopontin-deficient mice. *J Immunol.* 2002 Mar 1;168(5):2096-9.

9. ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI

- Cappellano G, Orilieri E, Woldetsadik AD, Boggio E, **Soluri MF**, Comi C, Sblattero D, Chiocchetti A, Dianzani U. Anti-cytokine autoantibodies in autoimmune diseases. *Am J Clin Exp Immunol*. 2012.
- Boggio E, Melensi M, Bocca S, Chiocchetti A, Comi C, Clemente N, Orilieri E, **Soluri MF**, D'Alfonso S, Mechelli R, Gentile G, Poggi A, Salvetti M, Ramenghi U, Dianzani U. The -346T polymorphism of the SH2D1A gene is a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation in males with defective Fas function. *Hum Immunol*. 2012 73:585-92.
- Sergio Occhipinti , Chiara Dianzani , Annalisa Chiocchetti , Elena Boggio , Nausicaa Clemente, Casimiro Gigliotti, **Maria F Soluri**, Rosalba Minelli, Roberto Fantozzi, Junji Yagi, Jose Rojo, Daniele Sblattero, Mirella Giovarelli and Umberto Dianzani. Triggering of B7h by the inducible costimulator modulates maturation and migration of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2012 Dec 28. [Epub ahead of print]
- Mesturini Riccardo, Gigliotti Casimiro, Orilieri Elisabetta, Cappellano Giuseppe, **Soluri, Maria F**, Boggio Elena, Woldetsadik Abiy, Dianzani Chiara, Sblattero Daniele, Chiocchetti Annalisa, Yagi Junji, Rojo, Josè and Dianzani Umberto Differential induction of IL-17, IL-10, and IL-9 in human T helper cells by B7h and B7.1. *Submitted Cytokine*.
- Maurizio Aricò, Elena Boggio, Valentina Cetica, Matteo Melensi, Elisabetta Orilieri, Nausicaa Clemente, Giuseppe Cappellano, Sara Buttini, **Maria Felicia Soluri**, Cristoforo Comi, Carlo Dufour, Daniela Pende, Irma Dianzani, Steven R. Ellis, Sara Pagliano, Stefania Marcenaro, Ugo Ramenghi, Annalisa Chiocchetti and Umberto Dianzani. Variations of the UNC13D gene in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome *Submitted PLoS One*.

Review Article

Anti-cytokine autoantibodies in autoimmune diseases

Giuseppe Cappellano^{1,2}, Elisabetta Orilieri^{1,2}, Abiy D Woldetsadik^{1,2}, Elena Boggio^{1,2}, Maria F Soluri^{1,2}, Cristoforo Comi^{1,3}, Daniele Sblattero^{1,2}, Annalisa Chiochetti^{1,2}, Umberto Dianzani^{1,2}

¹Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD), ²Department of Health Sciences, ³Department of Translational Medicine, "A. Avogadro" University of Eastern Piedmont, Novara, Italy

Received October 5, 2012; Accepted XXX, 2012; Epub XXX, 2012; Published XXX, 2012

Abstract: An overview of the current literature is showing that autoantibodies (AutoAbs) against cytokines are produced in several pathological conditions, including autoimmune diseases, but can also be detected in healthy individuals. In autoimmune diseases, these AutoAbs may also be prognostic markers, either negative (such as AutoAbs to IL-8 and IL-1 α in rheumatoid arthritis) or positive (such as AutoAbs to IL-6 in systemic sclerosis and those to osteopontin in rheumatoid arthritis). They may have neutralizing activity and influence the course of the physiological and pathological immune responses. High levels of AutoAbs against cytokines may even lead to immunodeficiency, such as those to IL-17 in autoimmune polyendocrine syndrome type I or those to IFN- γ in mycobacterial infections. Their role in human therapy may be exploited not only through passive immunization but also through vaccination, which may improve the costs for long lasting treatments of autoimmune diseases. Detection and quantification of these AutoAbs can be profoundly influenced by the technique used and standardization of these methods is needed to increase the value of their analysis.

Keywords: Cytokines, autoimmune diseases, autoantibodies, vaccines

Introduction

Autoimmunity arises from failure of the immune self-tolerance and may involve both T and B cells [1]. In most autoimmune diseases, T cells play a pivotal role in both dysregulation and autoimmune aggression, but autoantibodies (AutoAbs) are also widely produced. These autoAbs play a key pathogenic role in diseases such as Graves disease, autoimmune hemocytopenias, and systemic lupus erythematosus (SLE), but are also present in other diseases, where they may play a minor pathogenic role, but can be used as valuable diagnostic markers [2-4]. In addition to T cells and AutoAbs, also cytokines play a key role in development of the (auto)immune response and proinflammatory cytokines are deeply involved in the autoimmune damage. Interestingly, it has been noted that an anti-cytokine antibody response is spontaneously produced by healthy subjects and seems to be a physiologic mechanism to control the immune response. This modulating effect seems to be time-limited since the levels of these AutoAbs increase in response to cyto-

kine levels exceeding a threshold and, then, decrease after few weeks. This phenomenon is present also in several pathological conditions, including autoimmunity and some data suggest that endogenous anti-cytokine antibodies may be used as prognostic markers monitoring the disease [5-7]. In this context, cytokines are pivotal therapeutic targets of antagonistic drugs blocking their pathogenic effects in the disease; in this line, passive immunization with monoclonal antibodies (mAbs) against TNF- α [8], IL-1 [9], and IL-6 [10] are effective in rheumatoid arthritis (RA). However, most autoimmune diseases require long term treatment, which substantially raises the cost of therapies that are already expensive in terms of drug synthesis, development and implementation. An alternative approach is given by active immunization protocols aimed to support and enhance the endogenous production of anti-cytokine AutoAbs which would stably counteract the pathological effects of the cytokine. It has been shown that production of these AutoAbs can be effectively induced or boosted by active immunization with recombinant cytokines using

Anti-cytokine AutoAbs in health and diseases

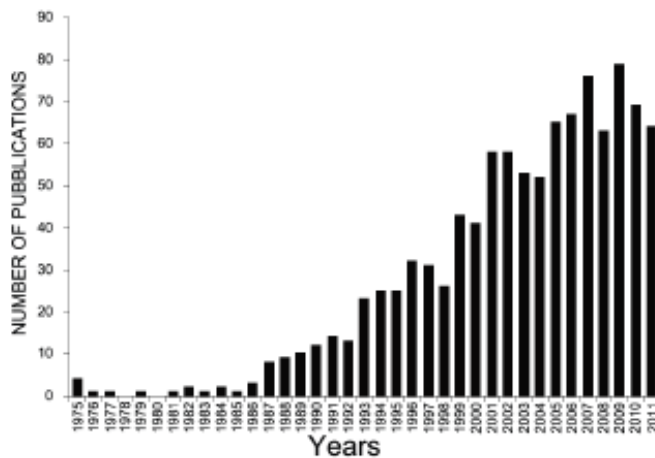


Figure 1. Number of publications focused on AutoAbs against cytokines between 1975 and 2011 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

either the protein or the naked DNA. The increasing interest on this topic is demonstrated by the growing literature published in the last 10 years (Figure 1) that this review will summarize and discuss.

Natural AutoAbs against cytokines in human autoimmune diseases

AutoAbs against cytokines have been described in various autoimmune diseases, such as RA, systemic sclerosis (SSc), multiple sclerosis (MS), SLE, autoimmune polyendocrine syndrome type I (APS-1), but their frequency and role has been extensively debated. The Table 1 reports the frequency of AutoAbs against cytokines in various autoimmune diseases compared to healthy controls, as detected by different authors. Since their analysis used several different techniques, it cannot be ruled out whether the wide differences between the studies are ascribable to the different population analyzed or to the technique used to detect the AutoAbs (see the methods section).

Anti-cytokine AutoAbs seem to be more frequently directed against proinflammatory cytokines, such as IL-1 α [11], TNF- α [12], IL-6 [13], IL-8 [14] and GM-CSF [15], whereas those against anti-inflammatory cytokines, such as IL-10 [16] and TGF- β [17] have been rarely reported. Unfortunately, most reports do not provide data about the functional effects of these AutoAbs, which would be helpful to define

their role in the disease and the possibility to exploit them in therapy. However, these AutoAbs have been suggested to have a protective role in some diseases and may be used as prognostic markers. For instance, high levels of anti-IL-1 α auto-Ab correlated with a mild disease course in patients with RA [7] and high levels of those against IFN- γ were associated with recovery in Guillain-Barré syndrome [18].

Four pro-inflammatory cytokines have been shown to play a key role in joint aggression in RA, i.e. TNF- α [19], IL-1 α , IL-1 β [19-21], and IL-6 [22] and the imbalance in the network of these cytokines have been suggested to play an orchestral role in the RA's initiation and progression [23].

Suzuki et al [24] and Maniwa et al [25] reported increased levels of AutoAbs against IL-1 α (but not IL-1 β) in the sera of RA patients and showed that they were higher in those with nondestructive arthritis than in those with destructive arthritis. These data have been partly debated by other authors who detected these antibodies with similar frequencies in RA patients and healthy controls [26, 27]. Nevertheless, they suggested that these AutoAbs may be used as a positive prognostic marker if detected early in RA [26, 27], since several indices of disease activity and severity were significantly lower in the patients with high levels of anti-IL-1 α AutoAbs than in those with low levels of these autoAbs. In line with the clinical data, these AutoAbs displayed neutralizing activity on IL-1 α function in vitro by inhibiting proliferation of thymocytes [28] and IL-6 secretion of synoviocytes induced by IL-1 α , and blocked binding of IL-1 α to its receptor [29]. Anti-IL-1 α AutoAbs have been also detected in patients with SSc, an autoimmune disease characterized by dermal and visceral fibrosis and vasculopathy [30, 31]. These AutoAbs have been ascribed to the high amount of IL-1 α secreted in the skin [24]. Intriguingly, high titers of anti-IL-1 α AutoAbs have been also detected in two other dermal diseases, i.e. psoriasis and pemphigus, which suggests their involvement in regulation of cutaneous inflammation [32]. Moreover, SSc patients also display AutoAbs against IL-6 and these have been mainly associated with the cutaneous form of the disease

Anti-cytokine AutoAbs in health and diseases

Table 1. Summary of AutoAbs frequencies reported in human autoimmune diseases and healthy controls

Anti-cytokine Antibody	Disease(s)	Frequencies in patients vs healthy controls	Prognostic value	References
IL-1 α	RA	16,6% vs 5,6%	YES	[24]
		36% vs 38%		[91]
		18,9% vs 9,7%	YES	[26]
	RA/ILD	42,9% vs 15%		[26]
		56,2% vs 15%		[25]
IL-6	SLE	4,7% vs 5,6%		[24]
	SSc	6,3% vs 5,6%		[24]
OPN	SSc	17,3% vs 1,9%	YES	[33]
GM-CSF	T1DM	7,8% vs 3,9 %		[47]
	RA	15% vs 0%	YES	[48]
IL-12	FS	12,4% vs 0%		[36]
		3,2% vs 0%		[92]
		2,3% vs 0%		[36]
IL-3	MS	17,6% vs 0%		[93]
IFN- β	RA/SLE	3,1% vs 1,3%		[94]
IFN- ω	MS	4% vs 0%		[93]
	RA/SLE	5,9% vs 0%		[93]
IFN- α	MS	4% vs 0%		[93]
IL-17A	RA/SLE	5,9% vs 0%		[93]
IL-17F	RA/SLE	29,4% vs 1,4%		[93]
IL-22	APS-I	66,7% vs 0%		[6]
TNF- α	APS-I	93,9% vs 0%		[6]
	RA	90,9% vs 0%		[6]
	SLE	61% vs 80% (8%)*		[12]
		-	YES	[17]

Abbreviations: RA: Rheumatoid Arthritis; SLE: Systemic lupus erythematosus; SSc: Systemic sclerosis; T1DM: type 1 diabetes mellitus; FS: Fely's syndrome; MS: Multiple Sclerosis; APS-I: Autoimmune polyendocrine syndrome type I. ILD: interstitial lung disease; RD: rheumatic diseases. *The authors confirmed a strongest reaction in 8% of controls only.

compared to the visceral one, which suggests that they may influence the clinical outcome [33]. AutoAbs against IL-1 α [24] have been described also in patients with SLE, a systemic autoimmune disease due to deposition of immune complexes in several tissues, including skin, kidney, and joints [34], but no clinical correlations were found in this disease [5]. Moreover, SLE patients also displayed AutoAbs against TNF- α , and their levels were lower in the patients with active disease compared to those with inactive disease, which suggests that their presence marks exacerbations of the autoimmune aggression [17]. The same group also found high serum levels of anti-TGF- β AutoAbs and suggested that these may contribute to dysregulate the immune homeostasis

[17]. Finally, anti-GM-CSF AutoAbs have been detected in SLE patients with neutropenia and their levels inversely correlated with the neutrophil counts, which suggested that they might inhibit the hemopoietic function of this cytokine [35].

AutoAbs against proinflammatory cytokines are also found in MS, an autoimmune disease affecting the central nervous system (CNS) in young adults. MS patients may display high plasma levels of AutoAbs against TNF- α and IFN- γ , and low levels of AutoAbs against IL-4, and IL-10 [1, 16] but their biological role is not clarified yet. By contrast, anti-GM-CSF autoAbs have been rarely detected in MS patients [36], but a vaccine developed to neutralize this cyto-

Anti-cytokine AutoAbs in health and diseases

kine showed promising results in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [37], the animal model for MS; this result might be related to inhibition of the GM-CSF effect on glial cells and the function of other cytokines in CNS [38].

Beside these "classical" cytokines, new frontiers have been opened by the demonstration of the pathogenic role of other anti-cytokine AutoAbs, such as those against Osteopontin (OPN), IL-17, and IL-8, in autoimmunity.

OPN is a pleiotropic cytokine secreted by activated macrophages, leukocytes, and activated T lymphocytes and is present in the extracellular fluids, at the sites of inflammation, and in the extracellular matrix of mineralized tissues [39, 40]. High OPN serum levels have been reported in patients with various autoimmune diseases, such as autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS), MS, SLE [41-44]; in RA [45] and juvenile idiopathic arthritis [46], they may play a role in supporting inflammation and bone erosion [47]. Moreover, AutoAbs against OPN have been reported in RA patients and their level inversely correlated with markers of disease activity, such as serum levels of rheumatoid factor and C-reactive protein, and the erythrocyte sedimentation rate [48]. Intriguingly, passive immunization with antibodies against a cryptic epitope of the N-terminal portion of OPN exerted beneficial effects in mouse and primate models of RA [49]. Presence of anti-OPN AutoAbs is not exclusive of RA since it has been detected also in patients with type 1 diabetes [47] and mice with EAE. Steinman et al [50] showed that EAE induction triggered production of anti-OPN AutoAbs and remission occurred when their titers peaked. Moreover, they showed that mouse immunization with a plasmid encoding for OPN boosted production of these AutoAbs and ameliorated the chronic course of EAE when administered before EAE induction. In line with these data, we recently detected high levels of anti-OPN AutoAbs in patients with MS, but clinical correlations are not available yet (unpublished data).

Recently, the Th1/Th2 paradigm of the T helper response has been challenged by identification of another T helper cell type (Th17), which may play a role in several autoimmune diseases [51] by secreting cytokines such as IL-17A, IL-17F, IL-21, and IL-22 [51]. Autoimmune polyendo-

crine syndrome type I (APS-I), also known as autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED), is a rare inherited autoimmune disease due to mutations of the gene of AIRE, involved in thymocyte selection [52, 53]. High levels of autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 have been detected in APS-I patients displaying chronic mucocutaneous candidiasis [6] which suggests that they may inhibit the Th17 cell capacity to counteract this infection. Presence of anti-IL-17 AutoAbs in APS-I has been confirmed using a robust high-throughput radioligand binding assay (RLBA) that has been compared to the ELISA assay [54]. These findings support the hypothesis that anti-cytokine AutoAbs might favor candida infection by causing a partial immune deficiency. This is also supported by other reports describing development of mycobacterial or lysteria infections in patients with various autoimmune diseases (RA, Chron's diseases, psoriasis) treated with anti-TNF- α antibodies [55].

IL-8 is involved in chemotactic recruitment of inflammatory cells and is secreted by several cell types including synoviocytes participating in the destructive process of the joint synovial [56]. In RA, AutoAbs against IL-8 correlate with several inflammatory parameters, such as serum levels of C-reactive protein and immune complexes, and have been suggested to be a useful marker of disease severity in the patients with extra-articular manifestations [14].

Methods to detect AutoAbs against cytokines

Different reports display substantial discrepancies about the presence and the levels of AutoAbs against cytokines in both patients and healthy controls. It is difficult to rule out whether these differences are due to heterogeneity of the analyzed subjects or to the method used to detect the autoAbs. Two main methods have been used by most authors, i.e. ELISA and Western Blot (WB). Both of them use, as bait, recombinant cytokines that are either immobilized to plastic wells (ELISA) or separated by size on a nitrocellulose filter (WB). The bait cytokines are bound by the AutoAbs present in the proband's serum and are then detected by horseradish peroxidase- or alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies. Anti-human IgG polyclonal antibodies are generally used to detect the memory response and avoid

Anti-cytokine AutoAbs in health and diseases

the aspecific binding of low affinity IgM AutoAbs [57]. The set up of a reliable immunological test for the AutoAbs should take into consideration, and possibly avoid, a number of technical bias that could be introduced. A first problem arises from the formulation of the bait recombinant cytokines used for the test. These are often provided in solution with bovine serum albumin (BSA), used as a stabilizer. BSA, indeed, may cause aspecific signals because of the frequent reactivity of serum Ig with this "dietary" antigen. Sjöwall et al [58] revised their previous results concerning levels of anti-TNF- α AutoAbs in RA patients by demonstrating that anti-BSA antibodies were responsible for several false positives [58].

A second problem concerns the features of the epitope(s) recognized by the AutoAbs, since conformational epitopes, such as those reported for OPN in RA patients [48], may be lost in the assay. For instance, WB is inadequate to detect conformational epitopes since the bait cytokine is denatured in the SDS/PAGE run. Although ELISA may detect conformational epitopes, some of them may be lost as well due to distortions of the three-dimensional structure following the absorption of the bait cytokine to the plastic well. Moreover, the recombinant cytokine may lack epitopes displayed by the wild-type proteins, such as the glycosylated epitopes which are absent in the recombinant cytokines produced in prokaryotic cells. Finally, detection of the AutoAbs can be difficult in the serum because of the formation of immunocomplexes between the AutoAbs and the endogenous cytokines [59].

The specificity and sensitivity of the test could also be limited by the presence of heterophilic antibodies. These are multispecific antibodies of the early immune response or interfering antibodies of unknown origin [60]. These antibodies can bind Fc fragments of the human antibodies used in the immunoassay, giving false positive signals. To reduce this interference, their removal by PEG precipitation or heat treatment has been suggested by DeFroge et al [61].

To overcome some of the technical issues described above, innovative approaches have been recently developed such as those involving the conjugation of the bait cytokines with fluorescently labeled microsphere [62] or radio

iodine [63]. The particle-based multiplex assays have the advantages to detect the AutoAbs using small volumes of serum and to target multiple AutoAbs simultaneously in the same sample, by using microspheres conjugated with different fluorochromes and, then, detected by dedicated instruments or flow cytometry. Moreover, binding to the microspheres seems to have less distortion effects on the bait cytokine, than binding to a microtiter well. This method was successful for detection of AutoAbs in celiac disease, hypothyroidism or anti-phospholipid syndrome [64]. In Radio Immuno Assay (RIA) the soluble cytokine is radiolabeled [63] and allows to discriminate the saturable from the non-saturable binding because of the addition of a molar excess of the unlabeled cytokine which inhibits binding of the tracer [65-68]. Indeed, this method has been used to confirm the presence of anti-IL-17, -IL-22, and -IFN- α - β - γ AutoAbs in APS-I patients [54, 69].

Vaccination against cytokines: the therapeutic use of auto-antibodies

Current treatments of autoimmune diseases are based on administration of aspecific immunosuppressive reagents; they display a wide suppressive activity on multiple effector mechanisms of the immune response including those that may be minimally involved in the disease and should be preserved to counteract infections [70]. As an alternative to this approach, many efforts showed that passive immunotherapy using anti-cytokine mAbs may be a valuable therapeutic tool focusing the immunosuppression toward the effector mechanisms that are directly involved in the disease pathogenesis (reviewed in [71]).

In humans, the first effective anti-cytokine drug has been an anti-TNF- α (human/murine) chimeric mAb (Infliximab) initially used in RA, Crohn's disease, ulcerative colitis, psoriasis, and ankylosing spondylitis [72]. Then, this approach has been extended to other anti-TNF- α reagents and a fully human antibody (Golimumab) has been recently approved by FDA for treatment of acute arthritis [73]. Moreover, use of anti-TNF- α [8] antibodies has been flanked by use of anti-IL-1 [9] and anti-IL-6 [10] mAb in RA. Recently, a phase III trial reported the efficacy of a fully human antibody against IL-17A (AIN457) on psoriasis, RA, and uveitis [74]. Furthermore, a

Anti-cytokine AutoAbs in health and diseases

study evaluating the safety, tolerability, and efficacy of AIN457 in patients with relapsing-remitting MS is in progress to date (www.clinicaltrials.gov, Novartis).

The main side effects exerted by anti-cytokine passive immunization have been increased susceptibility to infections, risk of anaphylactic reactions, and decrease of the therapeutic efficacy due to production of anti-drug antagonistic antibodies [71]. A further severe problem is the high cost of this therapy that dramatically increased the cost per patient of these diseases.

Part of these problems might be overcome by moving to active immunization against cytokines, that is a novel promising approach for autoimmune disease treatment (reviewed in [75]). This strategy is aimed to transiently induce or increase the levels of neutralizing AutoAbs against a pathogenic cytokine in order to antagonize the cytokine harmful effects. To break the tolerance, the self-protein is often coupled to an antigenic carrier producing a hetero-complex (cytokine plus carrier protein) able to induce a carrier-specific T helper response that efficiently helps the autoreactive anti-cytokine B cell response. Carriers used to this aim have been synthetic virus like particles (VLPs) [76], keyhole limpet hemocyanin (KLH) [77], and ovalbumin (OVA) [78].

Extensive overviews of anti-cytokines vaccination have been published by Ratsimandresy et al [79], Delavallee et al [80] and Uyttenhove et al [81]. Dalum et al [82] has been the first to report successful vaccination against TNF- α in mice affected with collagen-induced arthritis (CIA) using a TNF- α protein modified by replacement with OVA sequences. Later on, Uyttenhove used IL-9 and IL-12 cross-linked to OVA to induce the respective AutoAbs and evaluate the role of these cytokines in *Leishmania major* infection [83]. The same strategy was effective in inducing anti-IL-12 AutoAbs which protected mice against EAE [84]. Moreover, protein vaccination against anti-IL-17A conferred protection against EAE [85]. All data reported to date are based on results obtained in animal models and showed that cytokine vaccination can be effective in controlling several autoimmune diseases and seems to be safe since no severe side effects, including increased susceptibility to infections, were reported [81].

Because of these promising results, new clinical trials have been developed for human therapy using *kinoids*, which are non toxic immunogenic cytokine derivatives inducing high titer of neutralizing Abs. They are produced as hetero-complexes of the cytokine coupled, by aldehyde treatment, to a foreign T helper carrier protein such as KLH or tetanus toxoid, both approved by FDA for clinical human use [86]. The human TNF- α coupled to KLH, previously shown to induce the production of AutoAbs against TNF- α in Ttg mice (transgenic for human TNF- α) with positive effects on their spontaneous arthritis [87], is being used in a clinical trial in RA patients resistant to conventional TNF- α antagonist. Moreover, a clinical trial is evaluating the safety and immunogenicity of a TNF- α -kinoid in patients with Crohn's Disease and an IFN- α -kinoid in SLE patients. (www.clinicaltrials.gov).

DNA vaccination is another approach to induce AutoAbs against cytokines. DNA-based vaccines can activate the immune system using CpG sequences binding Toll-like receptor 9 (TLR9) as an adjuvant [88]. DNA vaccination against human TNF- α prevented CIA in mice [89]. A DNA vaccine encoding for IL-18 conferred protection against the lupus-like autoimmune syndrome displayed by MRL*lpr/lpr* mice with decreased lymphoproliferation (a hallmark of the *lpr* disease), IFN- γ production, glomerulonephritis, renal damage, and mortality [90]. Data obtained in the animal models suggest that DNA vaccination is a powerful strategy and encourages its use in humans. However, DNA vaccination has potential risks limiting its use in humans, including development of malignancies due to integration of the plasmid DNA, or autoimmune responses against the tissue expressing the DNA vaccine, and difficulties in controlling the expression of the encoded molecules.

Conclusions

AutoAbs against cytokines are emerging as a novel tool in the follow up and prognostic evaluation of autoimmune diseases. However, a standard detection method(s) of these AutoAbs is required with the aim to avoid discordant results obtained by different research groups. Moreover, the anti-cytokine AutoAbs may be exploited to control the disease activity using inverse vaccination techniques that may substitute expensive passive immunization with

anti-cytokine antibodies. This possibility is supported by encouraging results obtained in experimental animal models of autoimmune diseases. However, the data suggesting that anti-cytokine AutoAbs may also be involved in increased susceptibility to infections raise the problem of safety of these treatments. Therefore, more work is needed to assess the kinetic of production of these AutoAbs during infections and vaccination in order to select protocols capable to induce a safe transient and reversible production of these immune modulators.

Acknowledgements

This work was supported by Fondazione Italiana Sclerosi Multipla 2012/R/12 (Genoa), Fondazione Cariplo (Milan), Associazione Italiana Ricerca sul Cancro (Milan), Regione Piemonte (Ricerca Sanitaria Finalizzata and Piattaforme Innovative), Fondazione Amici di Jean (Torino).

Address correspondence to: Dr. Umberto Dianzani, Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD) and Department of Health Sciences, "A. Avogadro" University of Eastern Piedmont, via Solaroli 17, I-28100 Novara, Italy. Phone: +390321660644; Fax: +390321620421; E-mail: umberto.dianzani@med.unipmn.i

References

[1] Keamey JF. Formation of autoantibodies, including anti-cytokine antibodies, is a hallmark of the immune response of early B cells. *J Interferon Res* 1994; 14: 151-152.

[2] Özen S, Berk Ö, Şimşek DG, Darcan S. Clinical course of Hashimoto's thyroiditis and effects of levothyroxine therapy on the clinical course of the disease in children and adolescents. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2011; 3: 192-197.

[3] McKee A, Peyerl F. TSI assay utilization: impact on costs of Graves' hyperthyroidism diagnosis. *Am J Manag Care* 2012; 18: e1-14.

[4] Sblattero D, Berti I, Trevisiol C, Marzari R, Tommasini A, Bradbury A, Fasano A, Ventura A, Not T. Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1253-1257.

[5] Slavikova M, Schmeisser H, Kontseikova E, Mateicka F, Borecky L, Kontsek P. Incidence of autoantibodies against type I and type II interferons in a cohort of systemic lupus erythema-

tosis patients in Slovakia. *J Interferon Cytokine Res* 2003; 23: 143-147.

[6] Puel A, Döffinger R, Natividad A, Chrabieh M, Barcenas-Morales G, Picard C, Cobat A, Ouachée-Chardin M, Toulon A, Bustamante J, Al-Muhsen S, Al-Owain M, Arkwright PD, Costigan C, McConnell V, Cant AJ, Abinun M, Polak M, Bougnères PF, Kumararatne D, Marodi L, Nahum A, Roifman C, Blanche S, Fischer A, Bodeimer C, Abel L, Lilić D, Casanova JL. Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Exp Med* 2010; 207: 291-297.

[7] Graudal NA, Svenson M, Tarp U, Garred P, Jurik AG, Bendtzen K. Autoantibodies against interleukin 1 alpha in rheumatoid arthritis: association with long term radiographic outcome. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 598-602.

[8] Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Sanchez Andrade A, Garcia-Pomua C, Martin J, Gonzalez-Gay MA. Short-term adalimumab therapy improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis refractory to infliximab. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2006; 24: 309-312.

[9] Chakraborty A, Tannenbaum S, Rordorf C, Lowe PJ, Floch D, Gram H, Roy S. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of canakinumab, a human anti-interleukin-1β monoclonal antibody. *Clin Pharmacokinet* 2012; 5: e1-18.

[10] Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1761-1769.

[11] Svenson M, Poulsen LK, Fomsgaard A, Bendtzen K. IgG autoantibodies against interleukin 1 alpha in sera of normal individuals. *Scand J Immunol* 1989; 29: 489-492.

[12] Fomsgaard A, Svenson M, Bendtzen K. Autoantibodies to tumour necrosis factor alpha in healthy humans and patients with inflammatory diseases and gram-negative bacterial infections. *Scand J Immunol* 1989; 30: 219-223.

[13] Hansen MB, Svenson M, Diamant M, Bendtzen K. Anti-interleukin-6 antibodies in normal human serum. *Scand J Immunol* 1991; 33: 777-781.

[14] Peichl P, Pursch E, Bröll H, Lindley U. Anti-IL-8 autoantibodies and complexes in rheumatoid arthritis: polyclonal activation in chronic synovial tissue inflammation. *Rheumatol Int* 1999; 18: 141-145.

Anti-cytokine AutoAbs in health and diseases

- [15] Svenson M, Hansen MB, Ross C, Diamant M, Rieneck K, Nielsen H, Bendtzen K. Antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a dominant anti-cytokine activity in human IgG preparations. *Blood* 1998; 91: 2054-2061.
- [16] Elkarim RA, Mustafa M, Kivisäkk P, Link H, Bakhiat M. Cytokine autoantibodies in multiple sclerosis, aseptic meningitis and stroke. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 295-299.
- [17] Sjöwall C, Emerudh J, Bengtsson AA, Sturfelt G, Skogh T. Reduced anti-TNFalpha autoantibody levels coincide with flare in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2004; 22: 315-323.
- [18] Elkarim RA, Dahle C, Mustafa M, Press R, Zou LP, Ekerfelt C, Emerudh J, Link H, Bakhiat M. Recovery from Guillain-Barré syndrome is associated with increased levels of neutralizing autoantibodies to interferon-gamma. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 88: 241-8.
- [19] Arend WF, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 151-160.
- [20] Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87: 2093-147.
- [21] Joosten LA, Helsen MM, Saxne T, van de Loo FA, Heinegard D, van den Berg WB. IL-1alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *J Immunol* 1999; 163: 5049-5055.
- [22] Le Huu D, Matsushita T, Jin G, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Fujimoto M. IL-6 Blockade Attenuates the Development of Murine Sclerodermatous Chronic Graft-Versus-Host Disease. *J Invest Dermatol* 2012 (in press).
- [23] Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423: 356-361.
- [24] Suzuki H, Ayabe T, Kamimura J, Kashiwagi H. Anti-IL-1 alpha autoantibodies in patients with rheumatic diseases and in healthy subjects. *ClinExpImmunol* 1991; 85:407-412.
- [25] Maniwa K, Ogushi F, Tani K, Ohmoto Y, Muraguchi M, Sone S. Increased incidence of autoantibodies to interleukin-1a in rheumatoid arthritis with interstitial lung disease. *Respirology* 2000; 5: 315-320.
- [26] Jouvenne P, Fossiez F, Banchereau J, Miossec P. High levels of neutralizing autoantibodies against IL-1 alpha are associated with a better prognosis in chronic polyarthritis: a follow-up study. *Scand J Immunol* 1997; 46: 413-418.
- [27] Hansen MB, Andersen V, Rohde K, Florescu A, Ross C, Svenson M, Bendtzen K. Cytokine autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1995; 24: 197-203.
- [28] Suzuki H, Kamimura J, Ayabe T, Kashiwagi H. Demonstration of neutralizing autoantibodies against IL-1 alpha in sera from patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1990; 145: 2140-2146.
- [29] Jouvenne P, Fossiez F, Garrone P, Djossou O, Banchereau J, Miossec P. Increased incidence of neutralizing autoantibodies against interleukin-1 alpha (IL-1 alpha) in nondestructive chronic polyarthritis. *J Clin Immunol* 1996; 16: 283-290.
- [30] Barnes J, Mayes MD. Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr Opin Rheumatol* 2012; 24: 165-170.
- [31] Sakkas LI. New developments in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Autoimmunity* 2005; 38: 113-116.
- [32] Mizutani H, Ohmoto Y, Kupper TS, Shimizu M. Endogenous neutralizing anti-IL-1 alpha autoantibodies in inflammatory skin diseases: possible natural inhibitor for over expressed epidermal IL-1. *J Dermatol Sci* 1998; 20: 63-71.
- [33] Takemura H, Suzuki H, Yoshizaki K, Ogata A, Yuhara T, Akama T, Yamane K, Kashiwagi H. Anti-interleukin-6 autoantibodies in rheumatic diseases. Increased frequency in the sera of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 940-943.
- [34] Olsen NJ, Li QZ, Quan J, Wang L, Mutwally A, Karp DR. Autoantibody profiling to follow evolution of lupus syndromes. *Arthritis Res Ther* 2012; 14: R174.
- [35] Hellmich B, Csemek E, Schatz H, Gross WL, Schnabel A. Autoantibodies against granulocyte colony-stimulating factor in Felty's syndrome and neutropenic systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2384-2391.
- [36] Meager A, Wadhwa M, Bird C, Dilger P, Thorpe R, Newsom-Davis J, Willcox N. Spontaneously occurring neutralizing antibodies against granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with autoimmune disease. *Immunology* 1999; 97: 526-532.
- [37] Abbott DJ, Blanchfield JL, Martinson DA, Russell SC, Taslim N, Curtis AD, Mannie MD. Neuroantigen-specific, tolerogenic vaccines: GM-CSF is a fusion partner that facilitates tolerance rather than immunity to dominant self-epitopes of myelin in murine models of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *BMC Immunol* 2011; 12: 72.
- [38] McLay RN, Kimura M, Banks WA, Kastin AJ. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor crosses the blood-brain and blood-spi-

- nal cord barriers. *Brain* 1997; 120: 2083-2091.
- [39] Boggio E, Indelicato M, Orilieri E, Mesturini R, Mazzarino MC, Campagnoli MF, Ramenghi U, Dianzani U, Chiocchetti A. Role of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the development of autoimmune lymphoproliferation. *Haematologica* 2010; 95:1897-1904.
- [40] Stępień E, Wypasek E, Stopyra K, Koniecznyńska M, Przybyło M, Pasowicz M. Increased levels of bone remodeling biomarkers (osteoprotegerin and osteopontin) in hypertensive individuals. *Clin Biochem* 2011; 44: 826-831.
- [41] Chiocchetti A, Indelicato M, Bensi T, Mesturini R, Giordano M, Sametti S, Castelli L, Bottarel F, Mazzarino MC, Garbarini L, Giacomelli F, Valesini G, Santoro C, Dianzani U, Ramenghi U, 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.
- [42] Chiocchetti A, Comi C, Indelicato M, Castelli L, Mesturini R, Bensi T, Mazzarino MC, Giordano M, D'Alfonso S, Momigliano-Richiardi P, Liguori M, Zorzon M, Amoroso A, Trojano M, Monaco F, Leone M, Magnani C, Dianzani U. Osteopontin-gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *J Neuroimmunol* 2005; 163: 172-178.
- [43] Barizzone N, Marchini M, Cappiello F, Chiocchetti A, Orilieri E, Ferrante D, Corrado L, Mellone S, Scorza R, Dianzani U, D'Alfonso S. Association of osteopontin regulatory polymorphisms with systemic sclerosis. *Hum Immunol* 2011; 72: 930-934.
- [44] D'Alfonso S, Barizzone N, Giordano M, Chiocchetti A, Magnani C, Castelli L, Indelicato M, Giacomelli F, Marchini M, Scorza R, Danielli MG, Cappelli M, Migliaresi S, Bigliardo B, Sabbadini MG, Baldissera E, Galeazzi M, Sebastiani GD, Minisola G, Ravazzolo R, Dianzani U, Momigliano-Richiardi P. Two single-nucleotide polymorphisms in the 5' and 3' ends of the osteopontin gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 539-547.
- [45] Sennels H, Sørensen S, Ostergaard M, Knudsen L, Hansen M, Skjødt H, Peters N, Colic A, Grau K, Jacobsen S. Circulating levels of osteopontin, osteoprotegerin, total soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, and high-sensitivity C-reactive protein in patients with active rheumatoid arthritis randomized to etanercept alone or in combination with methotrexate. *Scand J Rheumatol* 2008; 37: 241-247.
- [46] Masi L, Ricci L, Zulian F, Del Monte F, Simonini G, Capannini S, De Martino M, Brandi ML, Falcini F. Serum osteopontin as a predictive marker of responsiveness to methotrexate in juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2009; 36: 2308-2313.
- [47] Dodds RA, Connor JR, James IE, Rykaczewski EL, Appelbaum E, Dul E, Gowen M. Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 1666-1680.
- [48] Sakata M, Tsuruha JI, Masuko-Hongo K, Nakamura H, Matsui T, Sudo A, Nishioka K, Kato T. Autoantibodies to osteopontin in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2001; 28: 1492-1495.
- [49] Fan K, Dai J, Wang H, Wei H, Cao Z, Hou S, Qian W, Wang H, Li B, Zhao J, Xu H, Yang C, Guo Y. Treatment of collagen-induced arthritis with an anti-osteopontin monoclonal antibody through promotion of apoptosis of both murine and human activated T cells. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 2041-2052.
- [50] Steinman L, Youssef S, Van Venrooij N, Chabas D, Baranzini SE, Rittling S, Denhardt D, Sobel RA, Lock C, Pedotti R, Oksenberg JR. Response to Comment on "The Influence of the Proinflammatory Cytokine, Osteopontin, on Autoimmune Demyelinating Disease". *Science* 2003; 299: 1845.
- [51] Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 485-517.
- [52] Notarangelo LD, Mazza C, Forino C, Mazzolari E, Buzi F. AIRE and immunological tolerance: insights from the study of autoimmune polyendocrinopathy candidiasis and ectodermal dystrophy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4: 491-496.
- [53] Bøe AS, Knappskog PM, Myhre AG, Sørheim JI, Husebye ES. Mutational analysis of the autoimmune regulator (AIRE) gene in sporadic autoimmune Addison's disease can reveal patients with unidentified autoimmune polyendocrine syndrome type I. *Eur J Endocrinol* 2002; 146: 519-522.
- [54] Oftedal BE, Kämpe O, Meager A, Ahlgren KM, Lobell A, Husebye ES, Wolff AS. Measuring autoantibodies against IL-17F and IL-22 in autoimmune polyendocrine syndrome type I by radioligand binding assay using fusion proteins. *Scand J Immunol* 2011; 74: 327-333.
- [55] Harboe E, Damås JK, Omdal R, Frøland SS, Sjørsen H. Risk of infection through use of selective immunomodulating drugs for rheumatoid arthritis. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2012; 132: 1867-1871.
- [56] Firestein GS. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis: passive respond-

Anti-cytokine AutoAbs in health and diseases

- ers or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1781.
- [57] Joosten LA, Helsen MM, Saxne T, van de Loo FA, Heinegard D, van den Berg WB. IL-1alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *J Immunol* 1999; 163: 5049-5055.
- [58] Sjöwall C, Kastbom A, Almroth G, Wetterö J, Skogh T. Beware of antibodies to dietary proteins in "antigen-specific" immunoassays! falsely positive anticytokine antibody tests due to reactivity with bovine serum albumin in rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *J Rheumatol* 2011; 38: 215-220.
- [59] Elkon K, Casali P. Nature and functions of autoantibodies. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4: 491-498.
- [60] Primus FJ, Kelley EA, Hansen HJ, Goldenberg DM. "Sandwich"-type immunoassay of carcinoembryonic antigen in patients receiving murine monoclonal antibodies for diagnosis and therapy. *Clin Chem* 1988; 34: 261-264.
- [61] DeForge LE, Loyet KM, Delarosa D, Chinn J, Zamanian F, Chuntharapai A, Lee J, Hass P, Wei N, Townsend MJ, Wang J, Wong WL. Evaluation of heterophilic antibody blocking agents in reducing false positive interference in immunoassays for IL-17AA, IL-17FF, and IL-17AF. *J Immunol Methods* 2010; 362: 70-81.
- [62] Ding L, Mo A, Jutivorakool K, Pancholi M, Holland SM, Browne SK. Determination of human anticytokine autoantibody profiles using a particle-based approach. *J Clin Immunol* 2012; 32: 238-45.
- [63] de LemosRieper C, Galle P, Svenson M, Pedersen BK, Hansen MB. Preparation and validation of radio iodinated recombinant human IL-10 for the measurement of natural human antibodies against IL-10. *J Immunol Methods* 2009; 350: 46-53.
- [64] Binder SR. Autoantibody detection using multiplex technologies. *Lupus* 2006; 15: 412-21.
- [65] Hansen MB. Human cytokine autoantibodies. Characteristics, test procedures and possible physiological and clinical significance. *APMIS Suppl* 1996; 59: 1-33.
- [66] Svenson M, Hansen MB, Bendtzen K. Binding of cytokines to pharmaceutically prepared human immunoglobulin. *J Clin Invest* 1993; 92: 2533-2539.
- [67] Hansen MB, Svenson M, Bendtzen K. Serum-induced suppression of interferon (IFN) activity. Lack of evidence for the presence of specific autoantibodies to IFN-alpha in normal human sera. *Clin Exp Immunol* 1992; 88: 559-562.
- [68] Hansen MB, Svenson M, Abell K, Yasukawa K, Diamant M, Bendtzen K. Influence of interleukin-6 (IL-6) autoantibodies on IL-6 binding to cellular receptors. *Eur J Immunol* 1995; 25: 348-354.
- [69] Hapnes L, Willcox N, Oftedal BE, Owe JF, Gilhus NE, Meager A, Husebye ES, Wolff AS. Radioligand-binding assay reveals distinct autoantibody preferences for type I interferons in APS I and myasthenia gravis subgroups. *J Clin Immunol* 2012; 32: 230-7.
- [70] Kazatchkine MD, Kaveri SV. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med* 2001; 345: 747-755.
- [71] Prete M, Perosa F, Favoino E, Dammacco F. Biological therapy with monoclonal antibodies: a novel treatment approach to autoimmune disease. *Clin Exp Med* 2005; 5: 141-160.
- [72] Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P, et al. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol* 1993; 30: 1443-1453.
- [73] Zhou H, Jang H, Fleischmann RM, Bouman-Thio E, Xu Z, Marini JC, Pendley C, Jiao Q, Shankar G, Marciniak SJ, Cohen SB, Rahman MU, Baker D, Mascelli MA, Davis HM, Everitt DE. Pharmacokinetics and safety of golimumab, a fully human anti-TNF-alpha monoclonal antibody, in subjects with rheumatoid arthritis. *J Clin Pharmacol* 2007; 47: 383-396.
- [74] Hueber W, Patel DD, Dryja T, Wright AM, Korolova I, Bruin G, Antoni C, Draelos Z, Gold MH; Psoriasis Study Group, Durez P, Tak PP, Gomez-Reino JJ; Rheumatoid Arthritis Study Group, Foster CS, Kim RY, Samson CM, Falk NS, Chu DS, Callanan D, Nguyen QD; Uveitis Study Group, Rose K, Haider A, Di Padova F. Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci Transl Med* 2010; 2: 52ra72.
- [75] Le Buanec H, Bensussan A, Bagot M, Gallo RC, Zagury D. Active and passive anticytokine immune therapies: current status and development. *Adv Immunol* 2012; 115: 187-227.
- [76] Rohn TA, Jennings GT, Hernandez M, Grest P, Beck M, Zou Y, Kopf M, Bachmann MF. Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 2006; 36: 2857-2867.
- [77] Delavallée L, Semerano L, Assier E, Vogel G, Vuagniaux G, Laborie M, Zagury D, Bessis N, Boissier MC. Active immunization to tumor necrosis factor-alpha is effective in treating chronic established inflammatory disease: a long-term study in a transgenic model of arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R195.

Anti-cytokine AutoAbs in health and diseases

- [78] Uyttenhove C, Van Snick J. Development of an anti-IL-17A auto-vaccine that prevents experimental auto-immune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 2006; 36: 2868-2874.
- [79] Ratsimandresy RA, Rappaport J, Zagury JF. Anti-cytokine therapeutics: history and update. *Curr Pharm Des* 2009; 15: 1998-2025.
- [80] Delavallée L, Duvallet E, Semerano L, Assier E, Boissier MC. Anti-cytokine vaccination in auto-immune diseases. *Swiss Med Wkly* 2010; 140: w13108.
- [81] Uyttenhove C, Van Snick J. Anti-cytokine auto-vaccinations as tools for the analysis of cytokine function in vivo. *Cytokine Growth Factor Rev* 2012; 23: 1-6.
- [82] Dalum I, Butler DM, Jensen MR, Hindersson P, Steinaa L, Waterston AM, Grell SN, Feldmann M, Elsner HI, Mouritsen S. Therapeutic antibodies elicited by immunization against TNF-alpha. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 666-669.
- [83] Arendse B, Van Snick J, Brombacher F. IL-9 is a susceptibility factor in *Leishmania major* infection by promoting detrimental Th2/type 2 responses. *J Immunol* 2005; 174: 2205-2211.
- [84] Uyttenhove C, Arendse B, Stroobant V, Brombacher F, Van Snick J. Development of an anti-IL-12 p40 auto-vaccine: protection in experimental autoimmune encephalomyelitis at the expense of increased sensitivity to infection. *Eur J Immunol* 2004; 34: 3572-3581.
- [85] Uyttenhove C, Sommereyns C, Théate I, Michiels T, Van Snick J. Anti-IL-17A autovaccination prevents clinical and histological manifestations of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1110: 330-336.
- [86] Bizzini B, Drouet B, Zagury D, Abitbol M, Burny A, Boissier MC. Kinoids: a family of immunogens for active anticytokine immunotherapy applied to autoimmune diseases and cancer. *Immunotherapy* 2010; 2: 347-365.
- [87] Semerano L, Assier E, Delavallée L, Boissier MC. Kinoid of human tumor necrosis factor-alpha for rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther* 2011; 11: 545-550.
- [88] Ishii KJ, Akira S. Innate immune recognition of, and regulation by, DNA. *Trends Immunol* 2006; 27: 525-532.
- [89] Shen Y, Chen J, Zhang X, Wu X, Xu Q. Human TNF-alpha gene vaccination prevents collagen-induced arthritis in mice. *Int Immunopharmacol* 2007; 7: 1140-1149.
- [90] Bossù P, Neumann D, Del Giudice E, Ciaramella A, Gloaguen I, Fantuzzi GD. IL-18 cDNA vaccination protects mice from spontaneous lupus-like autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 14181-14186.
- [91] Hansen MB, Svenson M, Abell K, Varming K, Nielsen HP, Bertelsen A, Bendtzen K. Sex- and age-dependency of IgG auto-antibodies against IL-1 alpha in healthy humans. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 212-218.
- [92] Hellmich B, Ciaglo A, Schatz H, Coakley G. AutoAbs against granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-3 are rare in patients with Felty's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 862-866.
- [93] Meager A, Wadhwa M, Dilger P, Bird C, Thorpe R, Newsom-Davis J, Willcox N. Anti-cytokine AutoAbs in autoimmunity: preponderance of neutralizing AutoAbs against interferon-alpha, interferon-omega and interleukin-12 in patients with thymoma and/or myasthenia gravis. *Clin Exp Immunol* 2003; 132: 128-136.
- [94] Hellmich B, Ciaglo A, Schatz H, Coakley G. AutoAbs against granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-3 are rare in patients with Felty's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 862-866.



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

Elena Boggio^a, Matteo Melensi^a, Sara Bocca^a, Annalisa Chiocchetti^a, Cristoforo Comi^{b,c}, Nausicaa Clemente^a, Elisabetta Orilieri^a, Maria Felicia Soluri^a, Sandra D'Alfonso^a, Rosella Mechelli^d, Giovanna Gentile^e, Alessandro Poggi^f, Marco Salvetti^d, Ugo Ramenghi^g, Umberto Dianzani^{a,*}

^a Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD) and Department of Health Sciences, "A. Avogadro" University of Eastern Piedmont, Novara, Italy

^b Department of Translational Medicine, "A. Avogadro" University of Eastern Piedmont, Novara, Italy

^c Neurorehabilitation Center, M.L. Novarese, Moncrivada, VerCELLI, Italy

^d Department of Neurology and Center for Experimental Neurological Therapy, S. Andrea Hospital, University of Roma La Sapienza, Rome, Italy

^e Department of Biochemical Sciences, - DIMA Centro Diagnostica Molecolare Avanzata, S. Andrea Hospital, University of Roma La Sapienza, Rome, Italy

^f Laboratory of Molecular Oncology and Angiogenesis, National Institute for Cancer Research, Genoa, Italy

^g Department of Pediatrics, University of Torino, Turin, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 December 2011

Accepted 27 February 2012

Available online 7 March 2012

Keywords:

SAP

Autoimmune Lymphoproliferation

XLP

Fas

ABSTRACT

Inherited defects decreasing function of the Fas death receptor cause autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) and its variant Dianzani autoimmune lymphoproliferative disease (DALD). Since a deleterious mutation of the *SH2D1A* gene protects *MRLlpr/lpr* mice from ALPS development, we investigated the role of *SH2D1A*, located in the X chromosome, in 51 patients with ALPS or DALD by mutational screening of coding and regulative sequences. Allelic frequency of the -346C>T polymorphism was different in male patients and controls (-346T: 61% vs 36%, $p = 0.01$), with similar frequencies in ALPS and DALD. By contrast, no differences were found among females or between the controls and patients with multiple sclerosis (229 males, 157 females). Further analyses showed that -346C was a methylation site in CD8⁺ T and natural killer cells, and *SH2D1A* expression was higher in -346T than in -346C males. Finally, *in vitro*-activated T cells from -346T males produced lower amounts of interferon- γ than those from -346C males. These data suggest that -346T is a predisposing factor for ALPS and DALD in males possibly because of its effect on SAP expression influencing the T-cell response.

© 2012 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Fas/Apo-1 (CD95) is a ubiquitous death receptor, and cells expressing it undergo apoptosis upon interaction with Fas ligand (FasL) [1–3]. In lymphocytes, Fas triggering does not induce apoptosis in resting and recently activated T cells, but the apoptosis-inducing pathway is connected to Fas several days after cell activation. This Fas/FasL interaction is involved in shutting off immune responses, regulating the lymphocyte lifespan, and maintaining peripheral tolerance. Moreover, cytotoxic T lymphocytes (CTL), T helper 1 (T_{H1}), and natural killer (NK) cells express FasL, whose interaction with Fas expressed by target cells is one of the mechanisms that they use to exert their cytotoxic function.

The autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) is characterized by defective function of Fas, autoimmune manifestations that predominantly involve blood cells (ie, thrombocytopenia, anemia, neutropenia), polyclonal accumulation of lymphocytes in the spleen and lymph nodes, and peripheral expansion of T-cell recep-

tor (TCR) $\alpha\beta^+$ CD4/CD8 double-negative (DN) T cells [4–9]. Moreover, ALPS patients are predisposed to develop lymphomas in adulthood [10].

Most ALPS cases are caused by deleterious mutations of the Fas gene (ALPS-FAS), although a few patients carry mutations of the FasL gene (ALPS-FASL) or the caspase 10 gene (ALPS-CASP10). However, the mutated gene is not known in a substantial proportion of patients (ALPS-U) [4–9]. In mice, a disease overlapping ALPS is displayed by *MRLlpr/lpr* and *gld/gld* mice, carrying mutations of the Fas and the FasL gene, respectively [1,2,11]. Moreover, we described an incomplete form of ALPS fulfilling the first three criteria but lacking an expansion of DN T cells. These patients did not display Fas, FasL, or caspase 10 mutations, although most of their parents displayed the Fas function defect, and we suggested an involvement of inherited mutations hitting the Fas pathway downstream from the receptor [9,12–14]. Because the complete paradigm of ALPS could not be demonstrated, this form has been named Dianzani autoimmune lymphoproliferative disease (DALD) by McKusick (OMIM Database ID: 601240, reference #605233) [9].

* Corresponding author.

E-mail address: dianzani@med.unipmn.it (U. Dianzani).

expression assay (Assay-on Demand; SAP, Assay No. Hs00158978_m1; Applied Biosystems). The glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH Assay No. Hs99999905_m1; Applied Biosystem) was used to normalize for cDNA amounts. Real-time PCR was performed using the 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) in duplicate for each sample in a 20 μ l final volume containing 1 μ l diluted cDNA, 10 μ l TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems), and 1 μ l Assay-on Demand mix. The thermocycler parameters were 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The results were analyzed with a Delta-Delta CT method.

2.6. Western blot analysis

Cells were washed twice with PBS and lysed for 20 min on ice in a lysis buffer (150 mmol/l NaCl, 20 mmol/l Tris-HCl, pH 8, 0.5% Nonidet P40 Substitute, 5 mM EDTA, aprotinin 1 μ g/ml, leupeptin 1 μ g/ml, pepstatin A 1 μ g/ml, PMSF 100 μ g/ml). Lysates were then cleared by centrifugation for 20 min at 13,000 rpm at 4°C and separated on 12% SDS-PAGE gel after denaturation in SDS-PAGE loading buffer (63 mmol/l Tris-HCl pH 6.8, 5% glycerol, 1% SDS, 2.5% bromophenol-blue), and transferred to nitrocellulose. Filters were then blocked in TBST buffer plus 5% non-fat milk for 1 hour and then incubated with anti-SAP monoclonal antibody (mAb) (Upstate, Lake Placid, NY) overnight at 4°C in TBST buffer plus 5% bovine serum albumin. SAP signals were revealed with a peroxidase-conjugated anti-mouse Ig secondary antibody (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and detected by enhanced chemiluminescence. β -Actin was detected with mouse mAb (Sigma) and detected with the same secondary antibody. Bands were quantified with the GelDoc EQ system (BioRad, Hercules, CA).

2.7. Functional assays

PBMC were cultured for 9 days in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, PHA (1 μ g/ml) and IL-2 (2 U/ml) to increase SLAM expression. Then, cells (1×10^6 /well) were seeded in round-bottom 96-well plates pre-coated with 100 μ l of anti-CD3 mAb (OKT3, 1 μ g/ml) overnight at 4°C, and cultured for 72 hours in the presence and absence of soluble anti-SLAM mAb (1 μ g/ml; BioLegend, San Diego, CA). Secretion of cytokines was evaluated in the supernatants after 72 hours of culture by capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Interleukin (IL)-4 and IFN- γ using ELISA MAX Deluxe (BioLegend), IL-10 and IL-17 using Human DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MN). To analyze cell proliferation, [3 H] thymidine (0.5 μ Ci/well) was added during the last 6 hours of culture; cells were then harvested and [3 H] thymidine uptake was evaluated with a β -counter (Perkin Elmer, Norwalk, CT).

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses of allele and genotype distributions were performed using the χ^2 test with the Yates correction. Haplotype analysis was performed using the Haploview program (3.11 version, Broad Institute of MIT and Harvard, 2003–2006). This program

also calculated pairwise linkage disequilibrium (LD) values (r^2 and Lewontin D') among the SNP alleles. Allele transmission from the mothers to the affected sons was evaluated according to the Affected Family-Based Control (AFBAC) method. In families ascertained for the presence of an affected child, the parental alleles not transmitted to the affected child were used as “control” alleles, whereas the parental transmitted alleles were used as “case” alleles. Transmission Disequilibrium Test (TDT) analysis was performed using Haploview program. The use of nuclear family data in case-control association studies was developed to avoid possible ethnic mismatching between patients and randomly ascertained controls. Functional data were analyzed with the nonparametric Mann-Whitney U test.

3. Results

3.1. Genetic analysis

To assess the role of *SH2D1A* in development of ALPS and DALD, the genomic DNA corresponding to the 5'UTR, the four exons and their intron/exon boundaries, and the 3'UTR of *SH2D1A* were sequenced in 31 male patients with ALPS or DALD (6 ALPS-FAS, 9 ALPS-U, and 16 DALD), and 369 male healthy controls, as variations of a X-linked gene would have a prominent effect in males. In both patients and controls, we only found three SNPs, ie. -346C>T (rs12164382) in the 5'UTR, and -494G>A (rs7357894) and -631G>A (rs990545) in the 5' flanking region (numeration is referred to ATG +1). Results showed that the frequencies of the -346T and -631A alleles were significantly higher in the patients than in the controls (-346T: 61% vs 36%; -631A: 61% vs 37%) and conferred an OR of 2.78 (95% CI = 1.24–6.30; $p = 0.01$) and 2.74 (95% CI = 1.22–6.22; $p = 0.01$), respectively, for ALPS or DALD development (Table 1). No significant difference was found in the frequency of -494G>A.

To assess whether a similar association was detectable in females too, we typed the three SNPs in 20 female patients with ALPS or DALD (three ALPS-FAS, nine ALPS-U, eight DALD) and 165 matched controls. Results showed that allelic and genotypic frequencies were similar in patients and controls among the females. Moreover, allelic frequency of -346T and -631A were significantly higher in the males than in the females among the patients (-346T: 61% vs 31%, $p = 0.029$; -631A: 61% vs 34%, $p = 0.049$). No significant difference was found in the frequency of the -494G>A alleles (Table 2).

Highly significant pairwise LD was observed between the three SNPs and, in particular, -346C>T was in almost perfect LD with -631G>A ($D' = 0.96$, $r^2 = 0.8$) (Table 3).

The Transcription Element Search System analysis program (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess>) showed that the three SNPs did not modify the putative binding sites of transcription factors, but -346C was reported as a putative methylation site [25], suggesting that -346C>T may influence the gene expression. Therefore, we focused our further analyses on -346C>T.

Table 1
Allele frequencies of different SNPs in *SH2D1A* in male ALPS/DALD patients and healthy controls

-346C>T			-494G>A		-631G>A				
	Allele	Controls ^a	Patients	Allele	Controls	Patients	Allele	Controls	Patients
C		235 (64%)	12 (39%)	G	215 (58%)	22 (71%)	G	234 (63%)	12 (39%)
T		134 (36%)	19 (61%)	A	154 (42%)	9 (29%)	A	135 (37%)	19 (61%)
Total		369	31		369	31		369	31
OR = 2.78 (95% CI = 1.24–6.30)		NS	OR = 2.74 (95% CI = 1.22–6.22)						
$p = 0.01^b$		$p = 0.01$							

CI, confidence interval; NS, Not significant; OR, odds ratio.

^aNumber of subjects; percentages are shown in parentheses.

^bPatients vs controls; p value uncorrected for number of comparisons.

Table 2
Allele frequencies of different SNPs in *SH2D1A* in female ALPS/DALD patients and healthy controls

-346C>T			-494G>A			-631G>A		
Allele	Controls ^a	Patients	Allele	Controls	Patients	Allele	Controls	Patients
C	206 (62%)	27 (68%)	G	191 (58%)	25 (59%)	G	203 (61%)	26 (66%)
T	124 (38%)	13 (31%)	A	139 (42%)	15 (41%)	A	127 (38%)	14 (34%)
Total	330	40	Total	330	40	Total	330	40
Genotype	Controls ^a	Patients	Genotype	Controls	Patients	Genotype	Controls	Patients
CC	67 ^b (40%)	9 (45%)	GG	55 (33%)	8 (40%)	GG	65 (40%)	9 (45%)
CT	72 (44%)	9 (45%)	GA	81 (49%)	9 (45%)	GA	73 (44%)	8 (40%)
TT	26 (16%)	2 (10%)	AA	29 (18%)	3 (15%)	AA	27 (16%)	3 (15%)
Total	165	20	Total	165	20	Total	165	20

^aNumber of chromosomes; percentages are shown in parentheses.

^bNumber of subjects; percentages are shown in parentheses.

Dissection of data according to the ALPS or DALD diagnosis showed that frequency of -346T was almost identical in ALPS and DALD patients in both males (ALPS: 60%, $n = 15$; DALD: 62%, $n = 16$) and females (ALPS: 33%, $n = 12$; DALD: 31%, $n = 8$). Clinical analysis did not detect any substantial difference between -346T and -346C patients in terms of the lymphoproliferative picture and autoimmune manifestations (data not shown).

Typing of the -346C>T alleles in the available fathers ($n = 21$) and mothers ($n = 22$) of the male patients showed that, among the non transmitted alleles (paternal alleles and non transmitted maternal alleles), frequencies (-346C: 60%; -346T: 40%) were similar to those detected in the healthy control groups, which showed that the general population used as a control was ethnically matched with the patients' families. Intriguingly, analysis of the heterozygous mothers by the TDT analysis showed a preferential transmission of -346T (transmitted:non transmitted alleles, 9:4), but results did not reach statistical significance because of the small number of subjects.

To assess whether -346T has a predisposing effect on autoimmune diseases different from ALPS and DALD, we typed this SNP in 386 patients with MS (229 males and 157 females). Results showed that allelic frequency of -346T was similar in MS patients (38% in both males and females) and the controls, with no gender differences (data not shown).

3.2. Functional analyses

To investigate whether the -346C>T alleles influence SAP expression, we analyzed the SAP mRNA level by real-time PCR in PBMC after 3 days of culture in the presence of PHA and IL-2, as preliminary experiments showed that SAP was minimally expressed in fresh cells but was substantially upregulated in these culture conditions. This analysis was performed in PBMC from males carrying -346C (healthy controls $n = 10$; patients $n = 5$) or -346T (healthy controls $n = 10$; patients $n = 4$). Results showed that -346T carriers, either controls or patients, displayed higher levels of SAP mRNA than the respective -346C carriers ($p = 0.001$ and $p = 0.01$, respectively) (Fig. 1). In some experiments, the cultured PBMC from the healthy controls (-346C: $n = 6$; -346T: $n = 6$) were used to positively purify the CD4⁺ (T_H), CD8⁺ (CTL) and CD16⁺ (NK) cell subsets using magnetic microbeads. Results showed that -346T

carriers displayed significantly higher levels of SAP mRNA than -346C carriers, in CTL ($p = 0.009$) and NK ($p = 0.002$) cells; by contrast, the difference was not significant in T_H cells (Fig. 2, left panel). To rule out the possibility that these results were influenced by the positive purification technique, CTL and NK cells (-346C: $n = 5$; -346T: $n = 5$) were negatively purified from fresh PBMC using the RosetteSep technique and then cultured as reported above. Analysis of SAP expression confirmed that -346T carriers displayed higher levels of SAP mRNA than -346C carriers in both cell types (CTL: $p = 0.03$; NK: $p = 0.04$) (Figure 2, right panel). Moreover, the -346C samples were used to evaluate the methylation state of this site by methylation-specific PCR. Results showed that -346C was methylated and its methylation level was higher in PBMC than in CTL and NK cells (Figure 3). Methylation analysis of PBMC derived from -346C male patients ($n = 5$) confirmed methylation of this site (range 17%–29%).

To assess whether the differential expression of SAP was detectable at the protein level too, we analyzed SAP expression by Western blot in PBMC from healthy males carrying -346C ($n = 10$) or -346T ($n = 10$), after 5 days of culture in the presence of PHA and IL-2. Results showed that -346T carriers displayed significantly higher levels of SAP than -346C carriers ($p = 0.02$) (Figure 4).

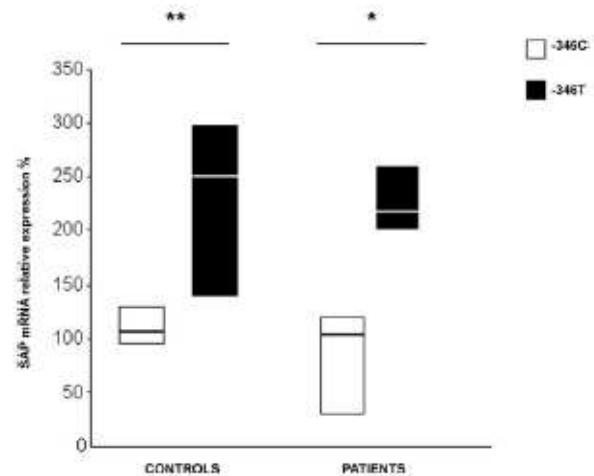


Fig. 1. SAP expression at the mRNA level in activated PBMC derived from healthy males and patients carrying -346C or -346T. PBMC from male patients (-346C: $n = 5$, -346T: $n = 4$) and healthy controls (-346C: $n = 10$, -346T: $n = 10$) were cultured in the presence of PHA and IL-2 for 3 days. Quantification of the SAP mRNA was evaluated by real-time PCR. The median expression level detected in -346C samples in each experiment was 100% expression. Horizontal lines show the median values and boxes the interquartile ranges. Statistical analyses were performed with the non parametric Mann-Whitney *U* test (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

Table 3
Linkage disequilibrium pattern of the three SNPs

-631G>A	-494G>A	-346C>T
-631G>A	$D' = 1$ $r^2 = 0.5$	$D' = 0.96$ $r^2 = 0.8$
-494G>A	$D' = 1$ $r^2 = 0.5$	$D' = 0.95$ $r^2 = 0.46$
-346C>T	$D' = 0.96$ $r^2 = 0.8$	$D' = 0.95$ $r^2 = 0.46$

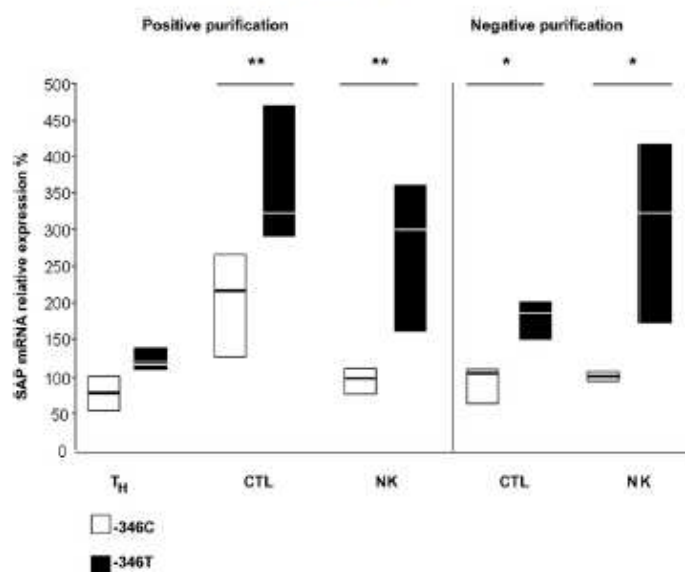


Fig. 2. SAP expression at the mRNA level in T_H , CTL, and NK cells derived from healthy males carrying -346C or -346T by positive and negative purification. Cell subsets were positively purified from PHA-activated PBMC (-346C: $n = 6$, -346T: $n = 6$) by magnetic microbeads (left panel) or negatively purified from fresh resting PBMC (-346C: $n = 5$, -346T: $n = 5$) and then cultured in the presence of PHA and IL-2 for 3 days (right panel). Quantification of the amount of the SAP mRNA was evaluated by real-time PCR and data are expressed as in Figure 1.

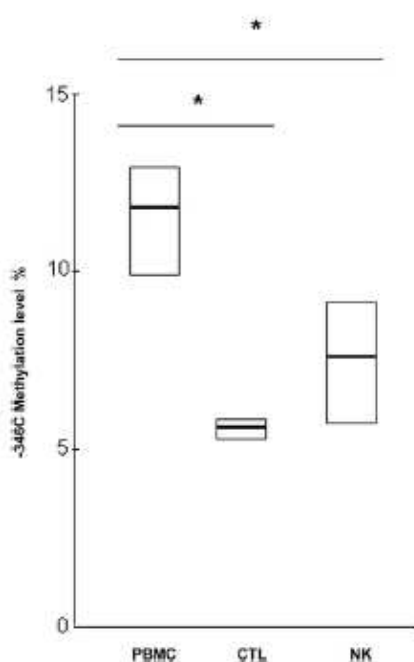


Fig. 3. SAP -346C methylation in PBMC, CTL, and NK cells derived from healthy males. Quantitative analysis of DNA methylation at the -346C site in amplified bisulphite CT-converted genomic DNA from the cells obtained from the -346C healthy males as described for the right panel of Figure 2. The methylation level is expressed as median values and interquartile ranges of the relative proportion of the unconverted methylated C and the T-converted unmethylated C. Statistical analyses were performed with the non parametric Mann-Whitney U test (* $p < 0.05$).

To assess whether the -346C>T variants influenced T-cell activation, we analyzed proliferation and cytokine secretion in T cells from healthy males carrying -346C ($n = 8$) or -346T ($n = 8$). PBMC were cultured for 9 days with PHA and IL-2 to increase SLAM expression. They were then activated with anti-CD3 mAb in the presence and absence of anti-SLAM mAb, and secretion of IFN- γ , IL-4, IL-10, and IL-17, and cell proliferation were evaluated after 3 days. Results showed that -346T carriers produced significantly less IFN- γ than -346C carriers without substantial differences in the presence and absence of SLAM stimulation (Figure 5, left panel). By contrast, no substantial differences were found in secretion of IL-4, IL-10, and IL-17 (data not shown), and cell proliferation (Figure 5, right panel) between -346C and -346T carriers. These experiments also showed that SLAM stimulation similarly increased cell proliferation in -346C and -346T carriers, but it did not modulate cytokine secretion.

4. Discussion

This work shows that the -346C>T variation of *SH2D1A* is associated with ALPS and DALD and hits a methylation site involved in SAP expression. In particular, patients with ALPS and DALD showed an increased frequency of the -346T allele that lacked the -346C methylation site and was associated with increased expression of SAP in NK and CD8⁺ T cells and decreased secretion of IFN- γ . These data support the possibility of an opposite epistatic relationship between Fas and SAP expression, which has been previously suggested in *MRL/lpr/lpr* mice in which a spontaneous A insertion at the 21st codon of *SH2D1A* (first exon) causing a frame-shift had resulted in defective expression of SAP and a striking reduction of hypergammaglobulinemia, autoantibody production, DN T-cells counts, lymphadenopathy, splenomegaly, and pathological indexes for glomerulonephritis and vasculitis [24].

In our patients and controls, we detected three SNP that were in strong LD and, in particular, -346C>T and -631G>A, which were significantly associated with ALPS/DALD, were in almost perfect LD, whereas their LD with -494G>A was weaker. The -346C>T SNP was the only one with a likely functional effect. The three SNPs

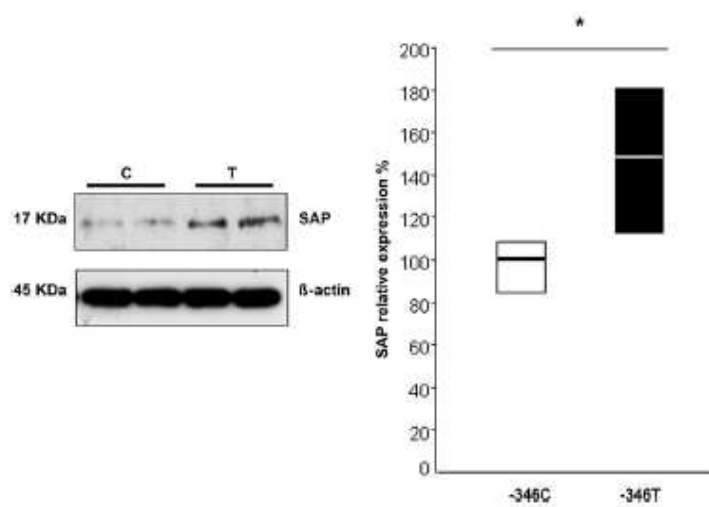


Fig. 4. SAP expression at the protein level in PBMC derived from healthy males carrying -346C or -346T. PBMC from healthy males (-346C: $n = 10$, -346T: $n = 10$) were cultured in the presence of PHA and IL-2 for 5 days and then SAP expression was evaluated by western blot. Left panel: Representative western blots of two -346C and two -346T samples. (Right panel) Densitometric quantification of SAP of results from all experiments. The median expression detected in the -346C samples in each experiment was 100% expression. Horizontal lines show the median values and boxes the interquartile ranges; statistical analysis was performed with the Mann-Whitney U test, ($*p < 0.05$).

were not included in transcription factor binding sites, but -346C had previously been shown to be a putative methylation site [25], and our work experimentally confirmed this possibility and showed that -346T hemizygotes expressed higher levels of SAP than -346C hemizygotes in NK and CD8⁺ T cells. Therefore, our data strongly suggest that -346T is directly responsible for the predisposing effect to ALPS/DALD development by increasing SAP expression. The finding that association with -346T was detected only in males and that, among patients, males displayed significantly higher frequency of -346T than females may reflect differential use of the -346C methylation site or other regulatory sites in males and females. This would be intriguing, as a gender influence in the ALPS picture was previously reported by Maric et al. [26], who showed that lymph nodes from male ALPS patients frequently displayed histopathological features of sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy, that were rare in female ALPS patients.

SAP has two functional domains for protein interaction [23,27–31]. The first is a SH2 domain which binds to a unique class of cytoplasmic tyrosine-based motifs present in receptors belonging to the SLAM family; SAP binds this site with high affinity and blocks its interaction with the tyrosine phosphatase SHP-2. The second domain binds the tyrosine kinase Fyn that propagates downstream signals that are essential to the function of the SLAM family members. These signals may play an important role to develop autoimmunity and lymphadenopathy in *MRL/lpr/lpr* mice since *lpr* T cells show an unusual activation of Fyn, that may support their survival [32,33]. Moreover, Fyn deficiency resulted in a marked reduction of lymphadenopathy and autoantibody production in these mice [34], that mimicked the effect of SAP deficiency.

ALPS and DALD share the clinical picture and defective Fas function, but are distinguished by DN T-cell expansion that is only present in ALPS. This difference is important from a diagnostic

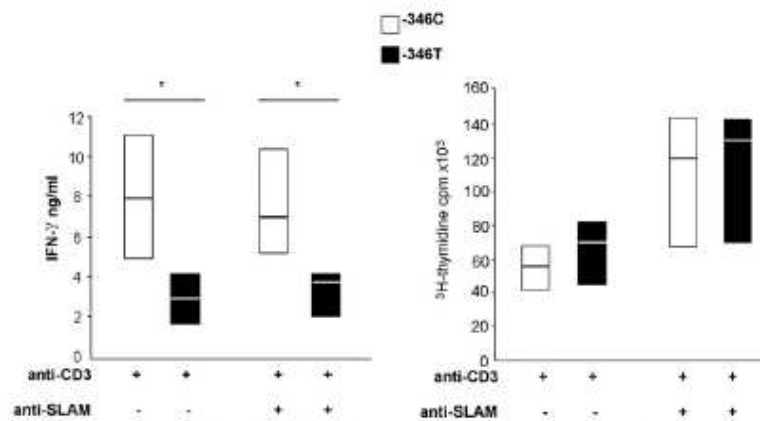


Fig. 5. IFN- γ production and proliferation in T cells from healthy males carrying -346C or -346T. PBMC from healthy controls (-346C: $n = 8$, -346T: $n = 8$) were cultured for 9 days in the presence of PHA and IL-2, then restimulated with anti-CD3 mAb for 3 days in the presence and absence of anti-SLAM mAb. Then, IFN- γ secretion (left panel) and cell proliferation (right panel) were measured. Horizontal lines show the median values and boxes the interquartile ranges. Statistical analysis was performed with the Mann-Whitney U test, ($*p < 0.05$).

point of view since the search for DNT cells is a first level laboratory analysis to diagnose ALPS, but it may also mark immunopathologic differences as DN T cells might play a direct role in ALPS development. Despite these differences, this work on SAP and our previous works on the *OPN* and *PRF* genes indicated that the genetic background predisposing to ALPS and DALD may be similar, as variations of these three genes predispose to both diseases. We previously suggested that the *OPN* and *PRF* gene variations cooperated with the Fas defect in slowing down the immune response switching off by inhibiting AICD and cytotoxic cell-mediated fratricide of activated immune cells, respectively, that flank Fas-induced apoptosis in eliminating activated immune cells [16–18]. A similar mechanism might also be involved in the predisposing effect mediated by -346T, as this variation was associated with decreased secretion of IFN- γ , that is a cytokine able to enhance FasL expression in T_H cells [35]. By contrast, the effect was not due to a direct effect on AICD and Fas-induced cell death, as they were similar in T cells derived from healthy males carrying -346C or -346T (data not shown). It is noteworthy that this picture is different from that displayed by XLP patients showing defective AICD and normal Fas-induced apoptosis [36].

The SLAM family of receptors comprise seven members: SLAM (CD150), 2B4 (CD244), CD84, CD48, NTBA (SLAMF6 or Ly108 in the mouse), Ly9 (CD229), and CD2-like receptor activating cytotoxic cells (CRACC or CD319) [27,30,31]. Most SLAM family members form homophilic interactions, whereas 2B4, an activating receptor for NK cells and CD8⁺ cytotoxic T cells, interacts with CD48 upregulated by EBV-infected B cells; the abnormal responses to EBV infection displayed by XLP patients are probably due in part to defects of 2B4-mediated cytotoxicity. However, 2B4 seemed not to play a role in our system since 2B4-mediated cytotoxicity was similar in -346C and -346T carriers (data not shown). Moreover, no role was found for SLAM whose triggering did not influence the differential IFN- γ secretion displayed by these donors.

A general role of SAP in autoimmunity has been suggested by the finding that SAP-deficient mice are protected not only from the *lpr* disease but also from EAE and pristane-induced lupus [31]. However, this general role does not seem to involve -346C>T, as we did not detect any association of this variation with MS. This makes a difference with the osteopontin and perforin gene variations that were found to be associated not only with ALPS and DALD but also with MS and other autoimmune diseases [37–40].

In conclusion, this work suggests that high SAP expression may favor lymphoproliferation in ALPS and DALD patients, and opens the way to the possibility that partial pharmacological inhibition of SAP might be beneficial to control these diseases.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fondazione Cariplo Ricerca (Milano), Fondazione Amici di Jean (Torino), Fondazione Italiana Sclerosi Multipla (FISM, Genova), Fondazione Cassa di Risparmio di Cuneo (Cuneo), Associazione Italiana Ricerca Cancro (AIRC Milano), Compagnia di San Paolo n.2007.2065 (Torino), and Regione Piemonte (Piattaforme Innovative Project- IMMONC). We are grateful to Andrew Martin Garvey for patiently reviewing our paper.

References

- [1] Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355–65.
- [2] Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000;407:789–95.
- [3] Dianzani U, Chiochetti A, Ramenghi U. Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity. *Life Sci* 2003;72:2803–24.
- [4] Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995;81:935–46.

- [5] Rieux-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;268:1347–9.
- [6] Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mouton JD. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* 1996;98:1107–13.
- [7] Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, Sneller M, et al. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 1999;98:47–58.
- [8] Lenardo MJ, Oliveira JB, Zheng L, Alips RVK. Ten lessons from an international workshop on a genetic disease of apoptosis. *Immunity* 2010;32:291–5.
- [9] Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U, Fleisher TA, Jaffe ES, Lenardo MJ, et al. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): Report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood* 2010;35–40.
- [10] Straus SE, Jaffe ES, Pack JM, Dale JK, Elkon KB, Rösen-Wolff A, et al. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 2001;98:194–200.
- [11] Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: *lpr* and *gld* mutations. *Immunol Today* 1995;16:39–43.
- [12] 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;89:2871–9.
- [13] Ramenghi U, Bonisani S, Migliaretti G, DeFranco S, Bottarel F, Gambaruto C, et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. *Blood* 2000;95:3176–82.
- [14] Campagnoli MF, Garbarini L, Quarello 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;91:538–41.
- [15] Jackson CE, Fischer RE, Hsu AP, Anderson SM, Choi Y, Wang J, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: Genotype influences penetrance. *Am J Hum Genet* 1999;64:1002–14.
- [16] Chiochetti 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;103:1376–82.
- [17] Boggio E, Indelicato M, Orilieri E, Mesturini R, Mazzarino MC, Campagnoli MF, et al. Role of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Haematologica* 2010;95:1897–904.
- [18] Clementi R, Chiochetti A, Cappellano G, Cerutti E, Ferrerri M, Orilieri E, et al. Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function. *Blood* 2006;108:3079–84.
- [19] Veillette A. Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol* 2006;6:56–66.
- [20] Morra M, Silander O, Calpe S, Choi M, Geerigen H, Myers L, et al. Alterations of the X-linked lymphoproliferative disease gene SH2D1A in common variable immunodeficiency syndrome. *Blood* 2001;98:1321–5.
- [21] Sayos J, Wu C, Morra M, Wang N, Zhang X, Allen D, et al. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 1998;395:462–9.
- [22] Engel P, Eck MJ, Terhorst C. The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat Rev Immunol* 2003;3:813–21.
- [23] Schwartzberg PL, Mueller KL, Qi H, Cannons JL. SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nat Rev Immunol* 2009;9:39–46.
- [24] Komori H, Furukawa H, Mori S, Ito MR, Terada M, Zhang MC, et al. A signal adaptor SLAM-associated protein regulates spontaneous autoimmunity and Fas-dependent lymphoproliferation in MRL-Fas *lpr* lupus mice. *J Immunol* 2006;176:395–400.
- [25] Parolini O, Weinhäusel A, Kagerbauer B, Sassmann J, Holter W, Gadner H, et al. Differential methylation pattern of the X-linked lymphoproliferative (XLP) disease gene SH2D1A correlates with the cell lineage-specific transcription. *Immunogenetics* 2003;55:116–21.
- [26] Maric I, Pittaluga S, Dale JK, Niemela JE, Delsol G, Diment J, et al. Histologic features of sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am J Surg Pathol* 2005;29:903–11.
- [27] Poy F, Yaffe MB, Sayos J, Saxena K, Morra M, Sumegi J, et al. Crystal structures of the XLP protein SAP reveal a class of SH2 domains with extended, phosphoryrosine-independent sequence recognition. *Mol Cell* 1999;4:555–61.
- [28] Laroui S, Roncaglioli R, Chen R, Bakinowski M, Shi X, Schwartzberg PL, et al. Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat Cell Biol* 2003;5:149–54.
- [29] Chan B, Lanyi A, Song HK, Griesbach J, Simarro-Grande M, Poy F, et al. SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat Cell Biol* 2003;5:155–60.
- [30] Detre C, Keszei M, Romero X, Tsokos GC, Terhorst C. SLAM family receptors and the SLAM-associated protein (SAP) modulate T cell functions. *Semin Immunopathol* 2010;32:157–71.
- [31] Chan AY, Westcott JM, Mooney JM, Wakeland EK, Schatzle JD. The role of SAP and the SLAM family in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2006;18:656–64.

- [32] Katagiri T, Urakawa K, Yamanashi Y, Semba K, Takahashi T, Toyoshima K, et al. Overexpression of src family gene for tyrosine-kinase p59fyn in CD4-CD8- T cells of mice with a lymphoproliferative disorder. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:10064–8.
- [33] Balomenos D, Rumold R, Theofilopoulos AN. The proliferative in vivo activities of lpr double-negative T cells and the primary role of p59fyn in their activation and expansion. *J Immunol* 1997;159:2265–73.
- [34] Takahashi T, Yagi T, Kakinuma S, Kurokawa A, Okada T, Takatsu K, et al. Suppression of autoimmune disease and of massive lymphadenopathy in MRL/lpr/lpr mice lacking tyrosine kinase Fyn (p59fyn). *J Immunol* 1997;159:2532–41.
- [35] Boselli D, Losana G, Bernabei P, Bosisio D, Drysdale P, Kiessling R, et al. IFN-gamma regulates Fas ligand expression in human CD4+ T lymphocytes and controls their anti-mycobacterial cytotoxic functions. *Eur J Immunol* 2007;37:2196–204.
- [36] Snow AL, Marsh BA, Krummey SM, Roehrs P, Young LR, Zhang K, et al. Restimulation-induced apoptosis of T cells is impaired in patients with X-linked lymphoproliferative disease caused by SAP deficiency. *J Clin Invest* 2009;119:2976–89.
- [37] Chiocchetti A, Comi C, Indelicato M, Castelli L, Mesturini R, Bensi T, et al. Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *J Neuroimmunol* 2005;163:172–8.
- [38] D'Alfonso S, Barizzone N, Giordano M, Chiocchetti A, Magnani C, Castelli L, et al. Two single-nucleotide polymorphisms in the 5' and 3' ends of the osteopontin gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000;55:539–47.
- [39] Cappellano G, Orilieri E, Comi C, Chiocchetti A, Bocca S, Boggio E, et al. Variations of the perforin gene in patients with multiple sclerosis. *Genes Immun* 2008;9:438–44.
- [40] Orilieri E, Cappellano G, Clementi R, Cometa A, Ferretti M, Ceruti E, et al. Variations of the perforin gene in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2008;57:1078–83.

Triggering of B7h by the inducible costimulator modulates maturation and migration of monocyte-derived dendritic cells

Running Title: B7h FUNCTION IN DENDRITIC CELLS

Sergio Occhipinti,^{*} Chiara Dianzani,[†] Annalisa Chiocchetti,[‡] Elena Boggio,[‡] Nausicaa Clemente,[‡] Casimiro Luca Gigliotti,[‡] Maria Felicia Soluri,[‡] Rosalba Minelli,^{†,‡} Roberto Fantozzi,[†] Jungi Yagi,[§] Josè Maria Rojo,[¶] Daniele Sblattero,[‡] Mirella Giovarelli,^{*} and Umberto Dianzani[‡]

^{*}Department of Medicine and Experimental Oncology, University of Torino, Torino, Italy;

[†]Department of Science and Pharmaceutical Technology, University of Torino, Torino, Italy;

[‡]Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD) and Department of Health Sciences, “A. Avogadro” University of Eastern Piedmont, Novara, Italy; [§]Department of

Microbiology and Immunology, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan; and

[¶]Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain

S.O., C.D. and A.C. contributed equally to this study.

Corresponding Author

Umberto Dianzani, IRCAD – Department of Health Sciences, Via Solaroli, 17 28100, Novara, Italy; phone number: +390321660644, fax number: +390321620421, e-mail: dianzani@med.unipmn.it

Grant Support

This work has been supported by Associazione Italiana Ricerca sul Cancro (AIRC, Milano), Compagnia di San Paolo (Torino), Regione Piemonte Piattaforme Innovative IMMONC project, Fondazione Italiana Sclerosi Multipla 2008/R/711 (FISM, Genova), Fondazione Amici di Jean (Torino).

Abbreviations used

DCs, dendritic cells; iDCs, immature dendritic cells; mDCs, mature dendritic cells; EC, endothelial cells; PMNs, polymorphonuclear cells; HDLEC, human dermal lymphatic endothelial cells; CM, culture medium; KLH, keyhole limpet hemocyanin; IQR, interquartile range

ABSTRACT

B7h, expressed by several cell types, binds ICOS expressed by activated T cells. We have previously shown that B7h triggering by ICOS-Fc inhibits human endothelial cell adhesiveness. This work investigated the effect of ICOS-Fc on human monocyte-derived dendritic cells (DCs). We found that DCs matured with LPS in the presence of ICOS-Fc (mDCs^{ICOS}) produced higher amounts of IL-23 and IL-10, and promoted a higher secretion of IL-17A and IL-17F in mixed lymphocyte cultures than did those matured with LPS alone (mDCs). Moreover, mDCs^{ICOS} pulsed with the KLH antigen during the maturation phase were better stimulators of antigen-specific MHC class I-, but not class II-, restricted T cells than mDCs. This was probably due to promotion of cross-presentation since it was not detected when the Flu-MA₅₈₋₆₆ antigen was directly loaded on already mature mDCs and mDCs^{ICOS}. Finally, ICOS-Fc inhibited the adhesion of both immature DCs and mDCs to vascular and lymphoid endothelial cells, their migratory activity, and expression of the Rac-1 activator β -Pix involved in cell motility. These data suggest that B7h stimulation modulates DCs function with effects on their maturation and recruitment into tissues. This opens a novel view on the use of interactors of the ICOS:B7h system as immunomodulatory drugs.

Introduction

Full activation of naïve T cells requires their receipt of three signals from APC (1). The first is delivered through the TCR upon recognition of the antigenic peptide presented by the appropriate MHC; the second is provided by T cell costimulatory molecules engaged by their ligands expressed on APC; and the third is delivered by cytokines in the microenvironment. In the absence of these signals, T cells become anergic or die by apoptosis (2). CD28, the best-known T cell costimulatory molecule, is constitutively expressed by T cells. It binds B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) on APC and promotes T cell proliferation and cytokine secretion (3,4). Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4) belongs to the CD28 family and binds the same ligands as CD28, but it transduces negative signals, down-modulating T cell activation. B7.1 and B7.2, too, transduce signals upon engagement by CD28 or CTLA-4 and modulate APC function: this has been described as "reverse signalling" (5). Reverse signalling triggered by CD28-Fc, a fusion molecule of the extracellular portion of CD28 with the Fc portion of IgG, leads to the production of IL-6 from mouse dendritic cells (DCs) and thus results in their activation, whereas CTLA-4-Fc up-regulates IDO and degrades tryptophan to products that inhibit T cell proliferation (5,6). Other members of the CD28 family are ICOS, Programmed Death 1 (PD-1), and B- and T-lymphocyte attenuator (BTLA) (7-10), whereas other members of the B7 family are B7h, B7H1, B7H3, B7H4, and B7-DCs (10,11-14).

ICOS (CD278) is a costimulatory molecule selectively expressed by activated T cells (7,15-17). It binds B7h (CD275, also known as B7H2, B7-RP1, ICOSL, GL50) expressed by both haematopoietic and non-haematopoietic cells. B7h is constitutively expressed by B cells, macrophages, DCs, and a subset of mouse spleen T cells. In monocytes, expression is up-regulated upon activation. B7h is also expressed by vascular endothelial cells (EC), epithelial cells, and fibroblasts (3,18-24). This expression pattern suggests that the ICOS:B7h interaction has a role in both T cell activation in lymphoid organs, and the control of T cell function at sites of inflammation. ICOS function has been extensively investigated in T cells, where it seems to modulate cytokine secretion by predominantly acting on recently activated/memory cells, whereas it is less effective in naïve T cells, whose activation and IL-2 secretion seem to mainly depend on CD28 costimulation (3,7,10,25-27). Moreover, substantial differences in ICOS function have been reported in mouse and human cells. In mice, ICOS triggering has been predominantly related to induction of IL-4-secreting Th2 cells, or IL-10-secreting regulatory T (Treg) cells, but it can also induce IFN- γ -secreting Th1 cells and support IL-17 secreting Th17 cells in some circumstances (28-30). In humans, it has been reported that ICOS-mediated costimulation of naïve Th cells elicits different responses depending on the cytokine milieu, since it promotes IFN- γ secretion in the

presence, and IL-10 and TGF- β secretion in the absence of IL-2 (31). Moreover, ICOS triggering has been shown to induce IL-17 secretion in a subset of cord blood cells (32). The differences between the two species might be partly due to the B7h capacity to weakly interact with CD28 and CTLA-4 in humans but not in mice, using binding sites different than that interacting with ICOS (33).

The primary aim of this work was to assess a different aspect of ICOS function, i.e. the reverse signaling, triggered through B7h, on human DCs and it was prompted by our recent research showing that B7h ligation by ICOS-Fc significantly inhibits the capacity of HUVEC to adhere to several tumor cell lines and polymorphonuclear cells (PMNs). Therefore, the B7h:ICOS interaction may modulate the spread of cancer metastases and the recruitment of PMNs in inflammatory sites (34). Moreover, other authors have shown that, in mice, B7h triggering induces partial maturation of immature DCs (iDCs) with prominent augmentation of IL-6 secretion (35).

In peripheral tissues, iDCs are specialized in antigen uptake and processing for MHC presentation (36,37). In the presence of inflammatory mediators, such as Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines, iDCs differentiate to mature DCs (mDCs) able to activate T cells and characterized by decreased endocytic activity, increased expression of costimulatory and MHC-class II (MHC-II) molecules, and increased cytokine secretion (38-40). They are at least 100 times more potent than macrophages in activating naïve T cells in vitro and are able to “cross-present” endocytosed proteins on MHC-class I (MHC-I), in addition to the standard presentation on MHC-II (41,42). iDCs are recruited to sites of inflammation by inducible inflammatory chemokines, such as CCL5, whereas mDCs are directed to draining secondary lymphoid tissues by constitutive chemokines, such as CCL19 and CCL21, via upregulation CCR7 (43). In this study, we show that the triggering of B7h substantially modulates LPS-induced maturation of DCs by influencing cytokine secretion and promoting cross-presentation. Moreover, it inhibits DCs adhesiveness to EC, their migratory activity, and expression of the Rac-1 activator β -Pix involved in cell motility.

Materials and Methods

Cells

PBMC were obtained by density gradient centrifugation from buffy coats provided by the local Blood Transfusion Service (Novara, Italy).

iDCs were prepared from CD14⁺ monocytes, isolated from PBMC with the Monocyte Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, GmbH, Germany), by culture for 5 days in culture medium (CM), composed of RPMI 1640 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), 2 mM L-glutamine (Invitrogen), and 10% FBS (Invitrogen) or serum free medium supplement (Lonza, Basel, Switzerland), supplemented with recombinant human GM-CSF (800 U/mL, Immunotools, Friesoythe, Germany) and IL-4 (10 ng/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN). Cytofluorimetric characterization showed that monocytes expressed CD14 and B7.2, but not CD1a, B7.1, and B7h. In iDCs, CD1a, B7.1, and B7h were up-modulated, CD14 was down-modulated, and B7.2 was unchanged (data not shown).

In the maturation assays, iDCs were cultured for 2 additional days in CM in the presence of LPS (*Escherichia coli*, serotype 055:B5, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 1 µg/mL or ICOS-Fc 1 µg/mL, or both. ICOS-Fc was a fusion protein of the extracellular portion of human ICOS fused to the human IgG1 Fc and similar results were obtained with purchased (R&D Systems) and in house produced reagents (34). Controls were performed using in house produced ^{F119S}ICOS-Fc, carrying the F119S substitution in the ICOS amino acid sequence, ICOS-msFc, in which the human ICOS was fused with a mouse Fcγ portion, and CTLA-4-Fc 1 µg/mL (R&D Systems). In some experiments, the soluble human IgG1 Fc was also used as a control (R&D Systems) and had no effect on DCs maturation (data not shown).

The DCs surface phenotype was assessed by immunofluorescence and flow cytometry using FITC- and PE-conjugated (mAb) to CD14, HLA-DR (Caltag, Burlingame, CA), CD1a, CD80, CD83, CD86, HLA-A,B,C (Becton Dickinson Pharmingen, San Jose, CA), and B7h (BioLegend, San Diego, CA).

Mannose receptor-mediated endocytosis

Cell endocytosis was assessed by evaluating uptake of FITC-dextran (molecular weight, 70 kDa; Invitrogen). Briefly, each DCs sample was split into two fractions of 1 x 10⁵ cells which were incubated with 1 mg/mL FITC-dextran at either 37° or 0°C for 60 minutes. Uptake was then stopped by adding ice-cold PBS followed by extensive washes in a refrigerated centrifuge, and cells were analysed by flow cytometry. Antigen uptake was expressed as the difference of mean fluorescence intensity (ΔMFI) between the test sample performed at 37°C and the control sample performed at 4°C.

Mixed Lymphocyte Culture (MLC)

DCs (5×10^3) were co-cultured in 96-well round-bottom plates for 5 days at a 1:20 DCs:lymphocyte ratio with allogeneic PBL or CD8⁺ or CD4⁺ T cells purified with the Human CD8 or CD4 Microbeads kits (Milteniy Biotec). Supernatants were then collected and used for cytokine analysis. In the final 6 hours of culture, 0.5 μ Ci [³H] thymidine (Perkin Elmer, Waltham, MA) were added to each well; cells were then harvested with a semiautomatic cell harvester and their radioactivity was measured with a β -counter (Perkin Elmer).

Cytokine analysis

IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, CCL20, TNF- α and IFN- γ were evaluated using standard ELISA (R&D Systems; BioLegend).

Antigen presentation assays

iDCs were resuspended at 1×10^6 /mL in serum-free RPMI 1640 and incubated with 10 μ g/mL keyhole limpet hemocyanin (KLH, Calbiochem, Darmstadt, Germany) for 6 hours at 37°C. They were then washed and resuspended in RPMI 1640 supplemented with 5% heat-inactivated AB human serum (Lonza), and matured for 24 hours with LPS in presence or not of ICOS-Fc. They were then cocultured with autologous T cells, purified with the Human PanT Microbeads Kit (Milteniy Biotec) at a DCs:T ratio of 1:10. On day 7, specific activation was evaluated by ELISpot assay on total T cells or on CD8⁺ or CD4⁺ T cells purified with the Human CD8 or CD4 Microbeads kits (Milteniy Biotec).

To assess whether ICOS-Fc modulated the ability to present HLA-A2-restricted peptides to T cells, differentially matured DCs from HLA-A2⁺ donors were resuspended at 1×10^6 /mL in serum-free RPMI 1640, pulsed with the influenza matrix Flu-MA₅₈₋₆₆ peptide (GILGFVFTL; Primm) (3 μ g/mL) for 4 hours at 37°C, and then cultured with autologous T cells at a 1:10 ratio. On day 7, the recovered cells were restimulated in the same conditions by Flu-MA₅₈₋₆₆-pulsed DCs and 1 ng/mL of recombinant IL-2 (Sigma-Aldrich). After another 7 days, specific activation was evaluated by ELISpot assay.

HLA-A2⁺ CD8⁺ T clones specific for Flu-MA₅₈₋₆₆ provided by Dr. Claudia Giachino (University of Torino, Italy) were expanded in RPMI 1640 supplemented with 5% AB human serum and IL-2 (250 U/mL, Sigma-Aldrich) and expanded every 2 weeks with 1 μ g/mL phytohaemagglutinin (PHA, Sigma-Aldrich), 250 U/mL IL-2, and 0.5×10^6 /mL allogenic-irradiated PBMC. They were used for the functional test 2 weeks after stimulation.

ELISpot assay

5×10^4 T cells were cultured, at a 30:1 ratio, with unpulsed or KLH-pulsed mDCs in a final volume of 100 μ L of AIM-V medium (Invitrogen) in 96-well ELISpot assay plates (Millipore, Bedford, MA, USA), previously coated with 100 μ l of human primary anti-IFN- γ mAb solution (BD Biosciences). In some experiments, 5×10^3 Flu-MA₅₈₋₆₆-T cells were cultured, at a 10:1 ratio, with unloaded and Flu-MA₅₈₋₆₆-loaded mDCs. ELISpot assays were performed following the manufacturer's instructions. Substrate (AEC Staining Kit, Sigma-Aldrich) was added to each well to develop the spots. Reaction was stopped after 10–20 minutes with water, and the membrane was left to dry in the dark. The spots were counted by computer-assisted image analysis (Transtec 1300 ELISpot Reader, AMI Bioline, Buttigliera Alta). Data are expressed as number of specific spots/ 10^5 cells; specific spots were those obtained in the presence of antigen-pulsed DCs minus those obtained in the presence of antigen-unpulsed DCs.

Cells adhesion assay

HUVEC were isolated from human umbilical veins by trypsin treatment (1%) and cultured in M199 medium (Lonza) with the addition of 20% FCS and 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 5 UI/mL heparin, 12 μ g/mL bovine brain extract, and 200 mM glutamine. HUVEC were grown to confluence in flasks and used at the 2nd-5th passage. Informed consent was obtained from all donors. Human Dermal Lymphatic Endothelial Cells (HDLEC) were purchased from PromoCell and cultured with Endothelial Cell Growth Medium MV2 (PromoCell, Heidelberg, Germany).

HUVEC and HDLEC were grown to confluence in 24-well plates and then treated or not with ICOS-Fc, or ^{F119S}ICOS-Fc or CTLA-4-Fc (2 μ g/mL) for 30 minutes, washed with fresh medium twice, and incubated for 1 hour with the iDCs or mDCs (5×10^4 cell/well). The 1 hour incubation time was chosen to allow full sedimentation of the adhering cells, but similar results were obtained with a shorter incubation time (30 minutes). In some experiments, iDCs or mDCs and HUVEC or HDLEC were pre-treated with ICOS-Fc, or ^{F119S}ICOS-Fc, or CTLA-4-Fc (2 μ g/mL) for 30 minutes, washed with fresh medium twice, and used in the adhesion assays. After incubation in the adhesion assay, non-adherent cells were removed by washing three times with M199. The centre of each well was analysed by fluorescence image analysis (33). Adherent cells were counted by the Image Pro Plus Software for micro-imaging (Media Cybernetics, Bethesda, MD, version 5.0). Single experimental points were assayed in triplicate, and the standard error of the three replicates was always below 10%. Data are shown as percentages of inhibition vs the control adhesion measured

on untreated HUVEC or HDLEC; this control adhesion was 2×10^2 cells/microscope fields (n=6) for iDCs and in a similar range for mDCs, in the adhesion to both HUVEC and HDLEC.

Migration assay

In order to determine the effects of ICOS-Fc on iDCs or mDCs migration, we used the Boyden chamber (BD Biosciences) migration assay. iDCs or mDCs (5×10^3 cell/well) were plated onto the apical side of 50 $\mu\text{g/mL}$ Matrigel-coated filters in serum-free medium in the presence and absence of ICOS-Fc, or F119S ICOS-Fc, or CTLA-4-Fc (2 $\mu\text{g/mL}$). Medium containing 10^{-6}M *N*-formyl-Met-Leu-Phe (nfMLP, Sigma-Aldrich) or 200 ng/mL CCL5 (R&D Systems) was placed in the basolateral chamber as chemoattractant for iDCs; 250 ng/mL CCL19 (R&D Systems) or 250 ng/mL CCL21 (R&D Systems) was used as chemoattractant for mDCs. After 6 hours, the cells on the apical side were wiped off with Q-tips. Cells on the bottom of the filter were stained with crystal-violet and counted (five fields of each triplicate filter) with an inverted microscope. The results are expressed as the number of migrated cells per high-power field.

Western blot analysis

Cells were treated or not with ICOS-Fc or F119S ICOS-Fc (4 $\mu\text{g/ml}$) at 37°C for 30 minutes. Then, they were lysed in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% v/v Triton X-100, phosphatase and protease (P2850, P8340, Sigma-Aldrich) inhibitors for 20 minutes at 4°C. The supernatants were collected after centrifugation at 14,000 rpm for 30 minutes, and 35 μg of proteins were run in a 9.3% SDS-polyacrilamide gel, and transferred onto a nitrocellulose membrane. Filters were blocked with TBS (10 mM TrisHCl pH 7.9; 150 mM NaCl) containing 5% nonfat milk and 1% Tween 20 for 1 hour at room temperature, and probed overnight with anti- β -Pix (SH3 domain) rabbit polyclonal antibody (Millipore, Billerica, MA) followed by the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary reagent and detected by enhanced chemiluminescence. Densitometric analysis was performed by the Multi-Analyst (version 1.1, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Friedman test followed by a Dunn post hoc analysis. Results are shown as medians and interquartile ranges (IQR).

Results

Effect of B7h stimulation on DCs maturation

Monocytes were induced to differentiate to iDCs by a 5-day culture with GM-CSF and IL-4. Because activation stimuli, such as LPS, induce iDCs maturation to mDCs, we assessed the effect of B7h stimulation in this process by using ICOS-Fc to trigger B7h. iDCs were treated for 2 days with control medium (iDCs), LPS (mDCs), ICOS-Fc (iDCs^{ICOS}), or LPS plus ICOS-Fc (mDCs^{ICOS}). We then compared their surface marker expression and endocytic, cytokine secretion, allostimulatory, and antigen presentation activities.

Analysis of surface expression of B7h, B7.1, B7.2, CD83, HLA-DR, and class I HLA, showed that treatment with LPS upregulated B7.1, B7.2, CD83, HLA-DR, and class I HLA as expected, whereas ICOS-Fc had no effect since no differences were found comparing iDCs with iDCs^{ICOS}, and mDCs with mDCs^{ICOS} (data not shown). Endocytic activity was assessed by evaluating uptake of FITC-conjugated dextran. Results showed that ICOS-Fc did not exert any effect on this activity since iDCs and iDCs^{ICOS} displayed the same ability to capture antigens, and that this activity was similarly down-regulated in mDCs and mDCs^{ICOS} (data not shown).

Assessment of cytokine secretion by measuring levels of IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-23, and TNF- α in the supernatants of the 2-day DCs cultures showed that secretion of all these cytokines was almost undetectable in iDCs and it was unchanged in iDCs^{ICOS} (data not shown). Treatment with LPS upregulated secretion of IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-23, IL-1 β and TNF- α and, intriguingly, mDCs^{ICOS} displayed a different cytokine secretion pattern from mDCs, with higher secretion of IL-23 and IL-10, and lower secretion of IL-6 and, at a lesser extent, TNF- α (Fig. 1). By contrast, secretion of IL-12p70 and IL-1 β were unchanged (Fig.1). To assess the specificity of the ICOS-Fc effect, mDCs maturation was induced in the presence of either ^{F119S}ICOS-Fc, that is a mutated form of ICOS incapable to bind B7h (44), or ICOS-msFc, in which the human ICOS was fused with a mouse Fc γ portion to minimize interaction with the human Fc γ receptors, or CTLA-4-Fc, which binds B7.1/B7.2 but not B7h. Results showed that ICOS-msFc exerted the same effect as ICOS-Fc, whereas ^{F119S}ICOS-Fc did not exert any effect. CTLA-4-Fc increased IL-10, and decreased IL-6, and did not change IL-12p70 and IL-1 β similarly to ICOS-Fc but, differently from ICOS-Fc, it had no effect on IL-23 and TNF- α (Fig.1).

Evaluation of the DCs allostimulatory activity – by assessing the lymphocyte proliferative response of PBL, CD4⁺ and CD8⁺ T cells in allogeneic MLC – showed that lymphocyte proliferation induced by mDCs was significantly higher than that induced by mDCs^{ICOS} in all lymphocyte preparations (Fig. 2). To assess whether differences in cytokine secretion displayed by mDCs and

mDCs^{ICOS} paralleled differences in their ability to polarize the Th cell response, we evaluated secretion of IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, and CCL20 in the supernatants from these MLC. Compared to mDCs-driven MLC, MLC driven by mDCs^{ICOS} displayed significant up-modulation of IL-17A and IL-17F, and down modulation of IL-2 in PBL and CD4⁺ T cells (Fig.3). The effects induced by ICOS-Fc were not ascribable to binding of the Fc γ 1 portion of ICOS-Fc to DCs Fc γ receptors, since they were also displayed by mDC matured in the presence of ICOS-msFc, but not by those matured in the presence of F^{119S}ICOS-Fc (Fig. 3). By contrast, mDCs and mDCs^{ICOS} did not differ in their capacity to induce secretion of IFN- γ , IL-10, and CCL20 in all lymphocyte populations and IL-2 in CD8⁺ T cells (supplementary Table I). IL-4, IL-21, and IL-22 were undetectable in every cell population and in all experimental conditions (data not shown).

Similar experiments performed using iDCs and iDCs^{ICOS} detected minimal MLC proliferation and cytokine secretion with no substantial differences between iDCs and iDCs^{ICOS} (data not shown).

In the MLC, the ICOS-Fc effects were not due to decreased interaction between ICOS on T cells and B7h on DCs as a consequence of B7h down-modulation or blocking by the ICOS-Fc used to prepare mDCs^{ICOS}. Staining with anti-B7h mAb showed, in fact, similar expression levels in mDCs and mDCs^{ICOS}; and staining of these cells with anti-human Ig antibodies did not disclose any residual ICOS-Fc bound on the cell surface (data not shown). Moreover, surface expression of ICOS was not different in T cells activated in the different MLC settings (data not shown).

Effect of B7h stimulation on antigen presentation

To assess whether B7h triggering modulates DCs antigen presentation, iDCs were pulsed with KLH, matured with LPS in the presence and absence of ICOS-Fc, and then used as stimulators of autologous T cells (45). After 7 days of primary culture, T cells were re-challenged with the same stimulators in the presence and absence of MHC-I or MHC-II blocking antibodies; secretion of IFN- γ was then assessed by ELISpot to detect the MHC-II and MHC-I restricted response respectively, since IFN- γ secretion can efficiently detect activation of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The results showed that mDCs^{ICOS} induced higher proportions of IFN- γ secreting MHC-I restricted cells than mDCs, whereas both stimulators elicited similar responses in the MHC-II restricted population (Fig. 4A). Moreover, mDCs^{ICOS} displayed a similar stimulatory activity when matured in the presence of either ICOS-Fc or ICOS-msFc, whereas those matured in the presence of F^{119S}ICOS-Fc displayed a similar activity as plain mDCs. By contrast, mDCs matured in the presence of CTLA-4-Fc displayed lower stimulatory activity than plain mDCs in both MHC-I and MHC-II restricted T cells (Fig. 4A), which is in line with the notion that CTLA-4-Fc induces

suppressive functions in DCs (6). To confirm these results, in a distinct set of experiments, CD4⁺ and CD8⁺ cells were purified from the 7 day primary culture, re-challenged with the same stimulators, and analyzed for IFN- γ secretion by ELISpot. The results obtained with the different ICOS-Fc variants on purified CD4⁺ and CD8⁺ cells strictly paralleled those obtained with whole T cells in the presence of anti-MHC-I and -MHC-II antibodies respectively. The inhibitory effect of CTLA-4-Fc, too, was still detectable but it was significant in CD4⁺ cells only (Fig. 4B). Similar experiments performed in iDCs showed that iDCs and iDCs^{ICOS} displayed a similar low capacity to induce IFN- γ secreting cells in both MHC-I and MHC-II restricted T cells (data not shown).

The increased ability of mDCs^{ICOS} to activate MHC-I restricted T cells might be ascribed to potentiation of their capacity to cross-present endocytosed antigens in MHC-I or to increase of their intrinsic costimulatory activity. To distinguish between these possibilities, mDCs and mDCs^{ICOS} obtained from HLA-A2⁺ donors were pulsed with the influenza virus matrix peptide Flu-MA₅₈₋₆₆ after their maturation in order directly to load the peptide on surface HLA-A2 molecules, skipping the antigen processing step, and then used to activate autologous T cells. ELISpot analysis of IFN- γ secreting cells showed similar proportions of positive cells using mDCs, mDCs^{ICOS} or those matured in the presence of either ICOS-msFc or ^{F119S}ICOS-Fc, or CTLA-4-Fc (Fig. 4C). To confirm these results, the experiments were repeated using CD8⁺ T cell clones specific for Flu-MA₅₈₋₆₆ presented on HLA-A2⁺, as responder cells. In this case, too, ELISpot analysis did not detect substantial differences using the different stimulators (Fig. 4C). These data indicated that the increase of mDCs^{ICOS} ability to activate MHC-I restricted T cells might be ascribed to promotion of antigen cross-presentation and not to an increase in their costimulatory activity toward CD8⁺ T cells.

Effect of B7h stimulation on DCs adhesiveness and migration

In a previous work, we showed that ICOS-Fc inhibited adhesion of several tumor cell lines to HUVEC by triggering B7h expressed on either HUVEC or the tumor cell lines. To assess the effect of B7h triggering on iDCs and mDCs adhesion to ECs, we performed adhesion assays using both HUVEC and HDLEC. Either DCs or the EC lines were pretreated or not with ICOS-Fc for 30 minutes, washed, and incubated together in the adhesion assay; as a control, cells were treated with ^{F119S}ICOS-Fc or CTLA-4-Fc. The results showed that pre-treatment with ICOS-Fc significantly inhibited adhesion of both iDCs and mDCs to both HUVEC and HDLEC by about 50%. Inhibition was similar when B7h was triggered on either ECs or DCs or both cell types. By contrast, pretreatment with ^{F119S}ICOS-Fc or CTLA-4-Fc had no effect (Fig. 5).

Since adhesive mechanisms are also involved in DCs migration, we used a Boyden chamber

migration assay to investigate the effect of B7h triggering on spontaneous migration of iDCs and mDCs, migration of iDCs driven by nfMLP or CCL5, and migration of mDCs driven by CCL19 or CCL21. iDCs or mDCs were seeded in the upper chamber of a Boyden chamber in the absence and presence of either ICOS-Fc, ^{F119S}ICOS-Fc, or CTLA-4-Fc, and left to migrate toward the lower chamber loaded with medium in the absence or presence of the above indicated chemotactic agents. The results showed that iDCs and mDCs displayed a spontaneous migration that was increased by each chemoattractant and, in all conditions, substantially inhibited by ICOS-Fc, but not by ^{F119S}ICOS-Fc and CTLA-4-Fc (Fig. 6).

ICOS-Fc alters β -Pix-mediated signaling.

β -Pix is a Rac-1 activator involved in cell migration (46). Its downmodulation inhibits cell spreading, lamellipodial formation, and integrin-induced increase of Rac1 activity. To evaluate whether treatment with ICOS-Fc influences β -Pix expression, we treated iDCs and mDCs with ICOS-Fc or ^{F119S}ICOS-Fc for 30 minute and then analyzed β -Pix expression by Western blot. Results showed that treatment with ICOS-Fc decreased expression of β -Pix in both iDCs and mDCs, whereas no effect was exerted by ^{F119S}ICOS-Fc (Fig. 7).

Discussion

This work showed that reverse signaling mediated by B7h modulated the DCs response to LPS by influencing cytokine secretion and the ability to drive T cell activation and differentiation. Moreover, it modulated DCs adhesiveness and migration.

Analysis of surface marker expression, endocytic activity, and cytokine secretion showed that B7h triggering per se was unable to induce DCs maturation, whereas, as expected, this was induced by LPS with down-regulation of endocytic activity and up-regulation of B7.1, B7.2, CD83, and MHC expression, allostimulatory activity, and secretion of TNF- α , IL-6, IL-12, IL-10, and IL-23. Treatment with either ICOS-Fc or CTLA-4-Fc modulated this LPS-induced cytokine secretion with increase of IL-10 and decrease of TNF- α and IL-6, whereas IL-23 secretion was increased by ICOS-Fc only.

IL-1 β and IL-6 are involved in differentiation of proinflammatory Th17 cells characterized by secretion of IL-17, IL-21, IL-22, and IL-26, whereas IL-23 is involved in their expansion (30,47,48). Therefore, B7h triggering in DCs may promote expansion of differentiated Th17 cells through the increased IL-23 secretion, which was supported by the finding that mDCs^{ICOS} stimulated higher secretion of IL-17A and IL-17F than did plain mDCs in MLC assays. By contrast, they did not influence secretion of IL-21 and IL-22, secreted by subsets of Th17 cells (49, 50). Therefore, B7h triggering seemed to modulate DCs maturation by increasing their ability to expand Th17 cells, which was intriguing in light of data showing that the triggering of ICOS on T cells supports differentiation of Th17 cells in the presence of appropriate cytokine milieu (32). Therefore, the ICOS:B7h interaction between DCs and T cells may trigger bidirectional signals that biphasically cooperate to induce and expand Th17 cells. In the T cell activation step, ICOS triggering promotes differentiation of Th17 cells; in the DCs maturation step, B7h triggering promotes secretion of IL-23 supporting Th17 cell expansion.

A further effect mediated by B7h triggering was potentiation of mDCs ability to activate the T cell response to endocytosed antigens in the context of MHC-I involving CD8⁺ T cells, but not in the context of MHC-II involving CD4⁺ T cells. This seemed to be due to increased cross-presentation of the antigen and not to increased expression of either MHC-I or costimulatory molecules involved in activation of CD8⁺ T cells. The effect of B7h triggering, in fact, required antigen processing since it was detectable when KLH was loaded on maturing DCs, but not when the Flu-MA₅₈₋₆₆ peptide was loaded on already matured DCs. Specificity was shown by the ineffectiveness of F^{119S}ICOS-Fc and by the different effect exerted by CTLA-4-Fc, which inhibited mDCs ability to activate both the MHC-I and MHC-II restricted responses to KLH; this is in line with reports showing that CTLA-4-Fc induces DCs to produce the suppressive molecule IDO (6). Incomplete

understanding of the molecular machinery of cross-presentation makes difficult to conjecture how it may be supported by B7h triggering. However, it is noteworthy that the Th17-switch induced by B7h-stimulated DCs might further support the cross-presentation induced by B7h stimulation since IL-17 has been shown to promote cross-presentation in mice (51).

These results are quite different from those reported in regard to mouse bone marrow-derived DCs by Tang et al. showing that, in the absence of other stimuli, B7h triggering induced partial maturation of iDCs (35). This is mediated by a p38 MAPK dependent signal with selective augmentation of IL-6 secretion; a similar effect was detected by Orabona et al. by using CD28-Fc to trigger B7.1 and B7.2 (5). Moreover, in these murine DCs, B7h triggering increased expression of CD80, CD83, CD86, and MHC-II, phagocytosis, and antigen-presentation to CD4⁺ Th cells, and supported their polarization to Th1 cells (35). However, the differences between these data on mice and our results on human DCs are not surprising in light of the several different functions that ICOS displays in the two species (25-31). Finally, B7h triggering substantially inhibited adhesion of both iDCs and mDCs to vascular and lymphoid EC and their spontaneous and chemokine-driven migration. Again, the effect was specific because it was not induced by ^{F119S}ICOS-Fc and CTLA-4-Fc. Apparently, the effect was not due to modulation of the expression of adhesion molecules or chemokine receptors, as detected by surface immunofluorescence of CCR1, CCR7, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, MadCAM, E-selectin (CD62E), CD62P, CD15s (Sialyl Lewis X), Sialyl Lewis A, CD31, CD34, CD40, and CD44v (data not shown).

By contrast, ICOS-Fc down-regulated expression of β -Pix, a Rac-1 activator recruited by activated integrins and required for rapid nascent adhesion turnover. Downregulation of β -Pix expression prevent cell spreading, lamellipodial formation, and increase of Rac1 activity (44,52,53). By contrast in DCs, we did not detect any effect in ERK phosphorylation that we have previously shown to be down-modulated by ICOS-Fc in EC (34), and similar negative results were obtained on JNK, p38, AKT, STAT1, and STAT3 (data not shown).

DCs are the most potent APC of the immune system involved in the initiation of the acquired immune response, and they are the only type of APC that can activate naïve T cells and initiate the immune response (36,43,54). Key features of this activity are the abilities of iDCs to migrate to the sites of inflammation in response to inflammatory chemokines, to endocytose antigens, and to mature to mDCs moving to the T cell areas of secondary lymphoid organs, where they present the endocytosed antigens to both MHC-I and MHC-II restricted naïve T cells, and initiate the immune response. Most iDCs reside within the tissues and do not recirculate, but some of them constitutively traffic to lymph nodes via the afferent lymph and play a role in the induction of peripheral tolerance (36,54). Infection and inflammation dramatically increase DCs migration as

the result of maturation events that increase DCs motility and responsiveness to lymph tropic chemoattractants (36). In this process, mDCs downregulate chemokine receptors, such as CCR1, CCR2, CCR5, and CXCR1, required for pro-inflammatory chemotaxis in the tissues, and upregulate those, such as CCR7, required for migration to the lymph nodes. Their entry in the afferent lymphatics involves ICAM-1 and VCAM-1 and several other adhesion molecules only partly shared with those involved in the leukocyte interaction with vascular EC (36).

In this scenario, our data suggest that B7h triggering may play a key role in modulating DCs function. Its ability to block iDCs migration would be crucial for arresting these cells in the inflamed tissues where they can load the antigens in both MHC-II and MHC-I, favored by the effect of B7h triggering on cross-presentation. Then, its ability to block mDCs migration would be crucial to arrest these cells in the secondary lymphoid tissues where they can activate both CD4⁺ and CD8⁺ T cells and, possibly, support differentiation of Th17 cells. In this context, the inhibitory effect exerted by B7h signaling on DCs adhesion to EC might be important to inhibit the transendothelial migration of these cells and favor their permanence in the tissues.

ICOS-Fc has been used to treat several pathological conditions in mice with the aim of blocking the ICOS:B7h interaction. However, this and previous reports suggest that it may also act as an agonist of B7h signalling, and that these multifaceted effects may account for the heterogeneous results obtained in different disease models and using different types of ICOS antagonists. Therefore, before proposing therapeutic uses of ICOS-Fc, more work is needed to depict its global effect both in vitro and in vivo.

Acknowledgments

Contributions: S.O., C.D., and A.C. performed the functional experiments, analyzed the data, and contributed to writing the manuscript; E.B. and C.L.G. contributed to DCs preparation and analysis; N.C. to the cytokine analyses; R.M. to the adhesion, migration, and western blot assays; M.F.S. and D.S. to the preparation of the recombinant proteins; R.F., J.Y., M.G., and J.M.R. to designing the study and writing the manuscript; U.D. designed the study, supervised the research, and wrote the manuscript. We are grateful to the Obstetrics and Gynecology Unit, Martini Hospital, Torino, for providing human umbilical cords. The authors are grateful to G. Baldanzi for helpful discussion.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Kaliński, P. C., M. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today* 20: 561-567.
2. Kaiko, G. E., J. C. Horvat, K. W. Beagley, and P. M. Hansbro. 2008. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123: 326-338.
3. Greenwald, R. J., G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2005. The B7 family revisited. *Nat. Rev. Immunol.* 23: 515-548.
4. Chambers, C. A., and J. P. Allison. 1999. Costimulatory regulation of T cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 203–210.
5. Orabona, C., U. Grohmann, M. L. Belladonna, F. Fallarino, C. Vacca, R. Bianchi, S. Bozza, C. Volpi, B. L. Salomon, M. C. Fioretti, L. Romani, and P. Puccetti. 2004. CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86. *Nat. Immunol.* 5: 1134-1142.
6. Grohmann, U., C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni, P. Candeloro, M. L. Belladonna, R. Bianchi, M. C. Fioretti, and P. Puccetti. 2002. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* 3: 1097-1101.
7. Hutloff, A., A. M. Dittrich, K. C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos, and R. A. Kroczeck. 1999. ICOS is an inducible T cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397: 263-266.
8. Okazaki, T., Y. Iwai, and T. Honjo. 2002. New regulatory co-receptors: inducible co-stimulator and PD-1. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 779-782.
9. Watanabe, N., M. Gavrieli, J. R. Sedy, J. Yang, F. Fallarino, S. K. Loftin, M. A. Hurchla, N. Zimmerman, J. Sim, X. Zang, T. L. Murphy, J. H. Russell, J. P. Allison, and K. M. Murphy. 2003. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat. Immunol.* 4: 670-679.
10. Yoshinaga, S. K., J. S. Whoriskey, S. D. Khare, U. Sarmiento, J. Guo, T. Horan, G. Shih, M. Zhang, M. A. Coccia, T. Kohno, A. Tafuri-Bladt, D. Brankow, P. Campbell, D. Chang, L. Chiu, T. Dai, G. Duncan, G. S. Elliott, A. Hui, S. M. McCabe, S. Scully, A. Shahinian, C. L. Shaklee, G. Van, T. W. Mak, and G. Senaldi. 1999. T cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 402: 827-832.
11. Dong, H., G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* 5: 1365-1369.

12. Sica, G.L., I. H. Choi, G. Zhu, K. Tamada, S. D. Wang, H. Tamura, A. I. Chapoval, D. B. Flies, J. Bajorath, and L. Chen. 2003. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity* 18: 849-861.
13. Tseng, S. Y., M. Otsuji, K. Gorski, X. Huang, J. E. Slansky, S. I. Pai, A. Shalabi, T. Shin, D. M. Pardoll, and H. Tsuchiya. 2001. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J. Exp. Med.* 193: 839-846.
14. Zhang, G. B., Q. M. Dong, Y. Xu, G. H. Yu, and X. G. Zhang. 2005. B7-H3: Another Molecule marker for Mo-DCs? *Cell. Mol. Immunol.* 2: 307-311.
15. Buonfiglio, D., M. Bragardo, S. Bonisconi, V. Redoglia, R. Cauda, S. Zupo, V. L. Burgio, H. Wolff, K. Franssila, G. Gaidano, A. Carbone, C. A. Janeway Jr, and U. Dianzani. 1999. Characterization of a novel human surface molecule selectively expressed by mature thymocytes, activated T cells and subsets of T cell lymphomas. *Eur. J. Immunol.* 29: 2863-2874.
16. Buonfiglio, D., M. Bragardo, V. Redoglia, R. Vaschetto, F. Bottarel, S. Bonisconi, T. Bensi, C. Mezzatesta, C. A. Janeway Jr, and U. Dianzani. 2000. The T cell activation molecule H4 and the CD28-like molecule ICOS are identical. *Eur. J. Immunol.* 30: 3463-3467.
17. Redoglia, V., U. Dianzani, J. M. Rojo, P. Portoles, M. Bragardo, H. Wolff, D. Buonfiglio, S. Bonisconi, and C. A. Janeway Jr. 1996. Characterization of H4: a murine T lymphocyte activation molecule functionally associated with the CD3/TCR. *Eur. J. Immunol.* 26: 2781-2789.
18. Brodie, D., A. V. Collins, A. Iaboni, J. A. Fennelly, L. M. Sparks, X. N. Xu, P. A. van der Merwe, and S. J. Davis. 2000. LICOS, a primordial costimulatory ligand? *Curr. Biol.* 10: 333-336.
19. Liang, L., E. M. Porter, and W. C. Sha. 2002. Constitutive expression of the B7h ligand for inducible costimulator on naive B cells is extinguished after activation by distinct B cell receptor and interleukin 4 receptor-mediated pathways and can be rescued by CD40 signaling. *J. Exp. Med.* 196: 97-108.
20. Ling, V., P. W. Wu, H. F. Finnerty, K. M. Bean, V. Spaulding, L. A. Fouser, J. P. Leonard, S. E. Hunter, R. Zollner, J. L. Thomas, J. S. Miyashiro, K. A. Jacobs, and M. Collins. 2000. Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *J. Immunol.* 164: 1653-1657.
21. Mages, H. W., A. Hutloff, C. Heuck, K. Buchner, H. Himmelbauer, F. Oliveri, and R. A. Kroccek. 2000. Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand. *Eur. J. Immunol.* 30: 1040-1047.

22. Nurieva, R. I., J. Duong, H. Kishikawa, U. Dianzani, J. M. Rojo, I. C. Ho, R. A. Flavell, and C. Dong. 2003. Transcriptional regulation of Th2 differentiation by inducible costimulator. *Immunity* 18: 801-873.
23. Swallow, M. M., J. J. Wallin, and W. C. Sha. 1999. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNF- α . *Immunity* 11: 423-432.
24. Wang, S., G. Zhu, A. I. Chapoval, H. Dong, K. Tamada, J. Ni, and L. Chen. 2000. Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood* 96: 2808-2813.
25. Dong, C., A. E. Juedes, U. A. Temann, S. Shresta, J. P. Allison, N. H. Ruddle, and R. A. Flavell. 2001. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T cell activation and function. *Nature* 409: 97-101.
26. McAdam, A. J., R. J. Greenwald, M. A. Levin, T. Chernova, N. Malenkovich, V. Ling, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2001. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 409: 102-105.
27. Tafuri, A., A. Shahinian, F. Bladt, S. K. Yoshinaga, M. Jordana, A. Wakeham, L. M. Boucher, D. Bouchard, V.S. Chan, G. Duncan, B. Odermatt, A. Ho, A. Itie, T. Horan, J. S. Whoriskey, T. Pawson, J. M. Penninger, P. S. Ohashi, and T. W. Mak. 2001. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 409: 105-109.
28. Bauquet, A. T., H. Jin, A. M. Paterson, M. Mitsdoerffer, I. C. Ho, A. H. Sharpe, and V. K. Kuchroo. 2009. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat. Immunol.* 10: 167-175.
29. Nurieva, R. I., X. M. Mai, K. Forbush, M. J Bevan, and C. Dong. 2003. B7h is required for T cell activation, differentiation, and effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100: 14163-14168.
30. Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin-17. *Nature Immunol.* 6: 1133-1141.
31. Mesturini, R., S. Nicola, A. Chiocchetti, I. S. Bernardone, L. Castelli, T. Bensi, M. Ferretti, C. Comi, C. Dong, J. M. Rojo, J. Yagi, and U. Dianzani. 2006. ICOS cooperates with CD28, IL-2, and IFN-gamma and modulates activation of human naïve CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 36: 2601-2612.
32. Paulos, C.M., C. Carpenito, G. Plesa, M. M. Suhoski, A. Varela-Rohena, T. N. Golovina, R. G. Carroll, J. L. Riley, and C. H. June. 2010. The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human T(H)17 cells. *Sci. Transl. Med.* 2: 55-78.

33. Yao, S., Y. Zhu, G. Zhu, M. Augustine, L. Zheng, D. J. Goode, M. Broadwater, W. Ruff, S. Flies, H. Xu, D. Flies, L. Luo, S. Wang, and L. Chen. 2011. B7-h2 is a costimulatory ligand for CD28 in human. *Immunity* 34: 729-40
34. Dinzani, C., R. Minelli, R. Mesturini, A. Chiocchetti, G. Barrera, S. Boscolo, C. Sarasso, C. L. Gigliotti, D. Sblattero, J. Yagi, J. M. Rojo, R. Fantozzi, and U. Dinzani. 2010. B7h triggering inhibits umbilical vascular endothelial cell adhesiveness to tumor cell lines and polymorphonuclear cells. *J. Immunol.* 185: 3970-3979.
35. Tang, G., Q. Qin, P. Zhang, G. Wang, M. Liu, Q. Ding, Y. Qin, and Q. Shen. 2009. Reverse signaling using an inducible costimulator to enhance immunogenic function of dendritic cells. *Cell Mol. Life Sci.* 66: 3067-3080.
36. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767–811.
37. Steinman, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 271–296.
38. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.
39. Mellman, I., and R. M. Steinman. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106: 255–258.
40. Watts, T.H. 2005. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Ann. Rev. Immunol.* 23: 23-68.
41. Segura, E., and J. A. Villadangos. 2011. A modular and combinatorial view of the antigen cross-presentation pathway in dendritic cells. *Traffic* 12: 1677-85.
42. Amigorena, S., and A. Savina. 2010. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 22: 109-17.
43. Johnson, L. A., and D. G. Jackson. 2008. Cell traffic and the lymphatic endothelium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1131: 119-33.
44. Wang, S., G. Zhu, K. Tamada, L. Chen, and J. Bajorath. 2002. Ligand binding sites of inducible costimulator and high avidity mutants with improved function. *J. Exp. Med.* 195: 1033-1041.
45. Schlienger, K., N. Craighead, K. P. Lee, B. L. Levine, and C. H. June. 2000. Efficient priming of protein antigen-specific human CD4(+) T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96: 3490-3498.
46. Kuo, J. C., X. Han, C. T. Hsiao, J. R. 3rd Yates, and C. M. Waterman. 2011. Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for β -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat. Cell. Biol.* 13: 383-393.

47. Harrinton, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. 2005. Interleukin-17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunol.* 6: 1123-1132.
48. Zhu, J., and W. E. Paul. 2008. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell. Res.* 20: 4-12.
49. Suto, A., D. Kashiwakuma, S. Kagami, K. Hirose, N. Watanabe, K. Yokote, Y. Saito, T. Nakayama, M.J. Grusby, I. Iwamoto, and H. Nakajima. 2008. Development and characterization of IL-21-producing CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 205: 1369-1379.
50. Rutz, S., R. Noubade, C. Eidenschenk, N. Ota, W. Zeng, Y. Zheng, J. Hackney, J. Ding, H. Singh, and W. Ouyang. 2011. Transcription factor c-Maf mediates the TGF- β -dependent suppression of IL-22 production in T(H)17 cells. *Nat. Immunol.* 12: 1238-1245.
51. Xu, S., Y. Han, X. Xu, Y. Bao, M. Zhang, and X. Cao. 2010. IL-17A-producing gammadelta T cells promote CTL responses against *Listeria monocytogenes* infection by enhancing dendritic cell cross-presentation. *J. Immunol.* 185: 5879-87.
52. Schmidt, M. H., K. Husnjak, I. Szymkiewicz, K. Haglund, and I. Dikic. 2006. Cbl escapes Cdc42-mediated inhibition by downregulation of the adaptor molecule betaPix. *Oncogene* 25: 3071-3078.
53. Lee, J., I. D. Jung, W. K. Chang, C. G. Park, D. Y. Cho, E. Y. Shin, D. W. Seo, Y. K. Kim, H. W. Lee, J. W. Han, and H. Y. Lee. 2005. p85 beta-PIX is required for cell motility through phosphorylations of focal adhesion kinase and p38 MAP kinase. *Exp. Cell. Res.* 307: 315-328.
54. Bosco, M. C., D. Pierobon, F. Blengio, F. Raggi, C. Vanni, M. Gattorno, A. Eva, F. Novelli, P. Cappello, M. Giovarelli, and L. Varesio. 2011. Hypoxia modulates the gene expression profile of immunoregulatory receptors in human mature dendritic cells: identification of TREM-1 as a novel hypoxic marker in vitro and in vivo. *Blood* 117: 2625-2639.

Figure Legends

FIGURE 1.

Cytokine secretion of DCs treated with different stimuli. B7h triggering substantially modulates the cytokine pattern secreted by DCs. DCs were cultured with LPS in the presence and absence of either ICOS-Fc, or ICOS-msFc, or ^{F119S}ICOS-Fc, or CTLA-4-Fc in serum-free medium and culture supernatants were harvested after 2 days and examined for cytokine production by ELISA. Data represent the median and IQR of results from 8 independent experiments performed in triplicate and marked with distinct symbols. *: p<0.05 vs mDCs prepared with LPS alone.

FIGURE 2.

Alloreactive proliferation induced in different lymphocyte populations by DCs treated with different stimuli. mDCs were prepared in the presence and absence of either ICOS-Fc, or ICOS-msFc, or ^{F119S}ICOS-Fc, and used as stimulators against allogeneic PBL or purified CD4⁺ or CD8⁺ cells at a stimulator/responder ratio of 1:20 for 5 days. [³H] thymidine (0.5 μCi/well) was added in the final 6 hours of culture and radioactivity uptake was measured by a β-counter; data are expressed as median and IQR of the results from 6 experiments performed in triplicate and marked with distinct symbols.

*: p<0.05 vs mDCs prepared with LPS alone.

FIGURE 3.

Cytokine secretion induced in different lymphocyte population by DCs treated with different stimuli. mDCs were prepared in the presence and absence of either ICOS-Fc, or ICOS-msFc, or ^{F119S}ICOS-Fc, and used as stimulators as described in Figure 2. Cytokine secretion was assessed in the supernatants by ELISA after 5 days of culture; data are expressed as median and IQR of results from 6 experiments performed in triplicate and marked with distinct symbols. *: p<0.05 vs mDCs prepared with LPS alone.

FIGURE 4.

Antigen presentation activity of iDCs induced to mature with several stimuli. iDCs pulsed with KLH and matured with LPS in presence and absence of ICOS-Fc, or ICOS-msFc, or ^{F119S}ICOS-Fc, or CTLA-4-Fc were used as stimulators of autologous T cells in 7 day cultures. A, Lymphocytes recovered from each culture were restimulated in IFN-γ ELISpot plates with the same stimuli in the presence and absence of MHC-I (*left*) or MHC-II (*right*) blocking antibodies (n=6). B, CD4⁺ and

CD8⁺ cell were purified from the lymphocytes recovered from each culture and, then, restimulated in IFN- γ ELISpot plates with the same stimuli (n=6). C, HLA-A2⁺ DCs matured with LPS in the absence and presence of ICOS-Fc, or ICOS-mFc, or ^{F119S}ICOS-Fc, or CTLA-4-Fc, and subsequently loaded with Flu-MA₅₈₋₆₆ were used to stimulate autologous T cells previously expanded with the same stimulus (*left*) or HLA-A2⁺ matched anti-Flu-MA₅₈₋₆₆ CD8⁺ T cell clones (*right*) in IFN- γ ELISpot plates (n=4). Data are expressed as number of specific spots and are the medians and IQR of the results from 4-6 experiments performed in triplicate and marked with distinct symbols. *: p<0.05 vs to mDCs prepared with LPS alone.

FIGURE 5.

Effect of ICOS-Fc on iDCs and mDCs adhesion to EC lines. EC lines (HUVEC and HDLEC) and/or DCs (iDCs and mDCs) were pre-treated or not with ICOS-Fc, or ^{F119S}ICOS-Fc, or CTLA-4-Fc (2 μ g/mL) for 30 minutes, washed and then incubated together for 1 hour in the adhesion assay. The legend of the horizontal axes shows which cells were pre-treated with the indicated reagent. Data are expressed as the percentage of inhibition versus the control adhesion obtained with untreated cells and are the medians and IQR of the results from 5 experiments performed in triplicate. *: p<0.05 vs the control.

FIGURE 6.

Effect of ICOS-Fc on iDCs and mDCs migration. iDCs or mDCs were plated into the apical side of Matrigel-coated filters in the presence and absence of ICOS-Fc, or ^{F119S}ICOS-Fc, or CTLA-4 (2 μ g/mL). The basolateral chamber was loaded with medium in the presence and absence of nfMLP or CCL5 for iDCs, and CCL19 or CCL21 for mDCs. The cells migrated to the bottom of the filters were stained using crystal-violet and counted (5 fields of each triplicate filters) using an inverted microscope after 6 hours. Data are expressed as the migrated cells in each condition and are the medians and IQR of the results from 5 experiments performed in triplicate. *: p<0.05 versus the own control.

FIGURE 7.

Effect of ICOS-Fc on β -Pix expression in DCs. iDCs (*right*) or mDCs (*left*) were treated with ICOS-Fc or ^{F119S}ICOS-Fc (4 μ g/ml) for 30 minutes and then β -Pix and GADPH expression was analysed by Western blot. The upper panels show the β -Pix and GADPH expression from the same gel. The bar graphs show the medians and IQR of the densitometric analysis from 5 experiments. *: p<0.05 vs the control.

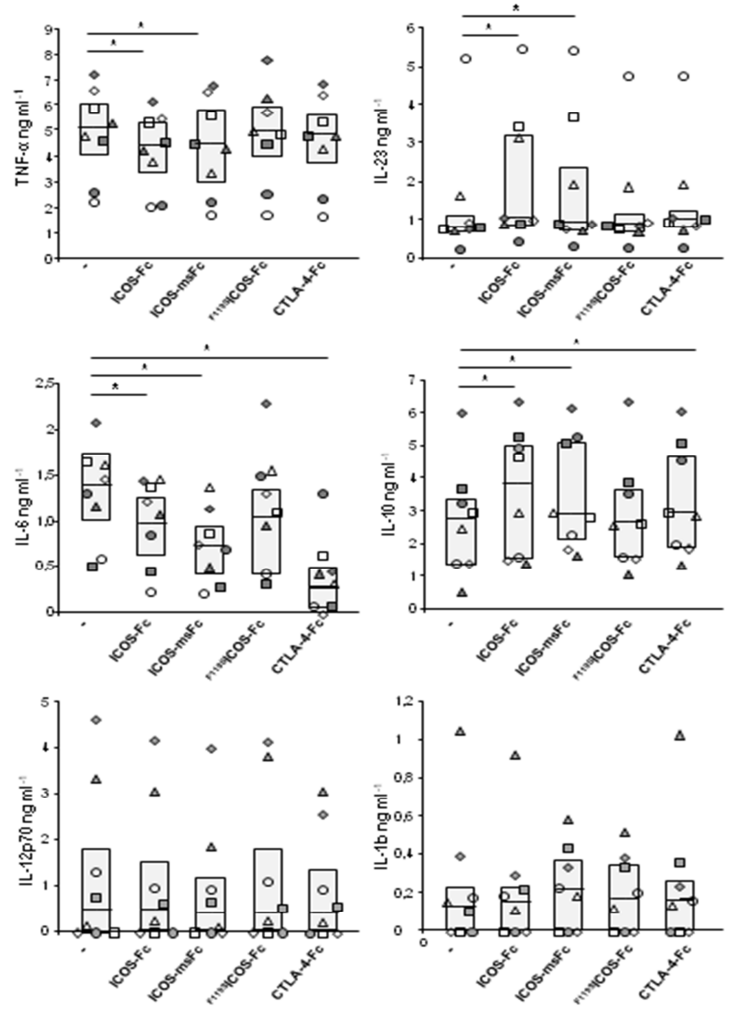


Figure 1

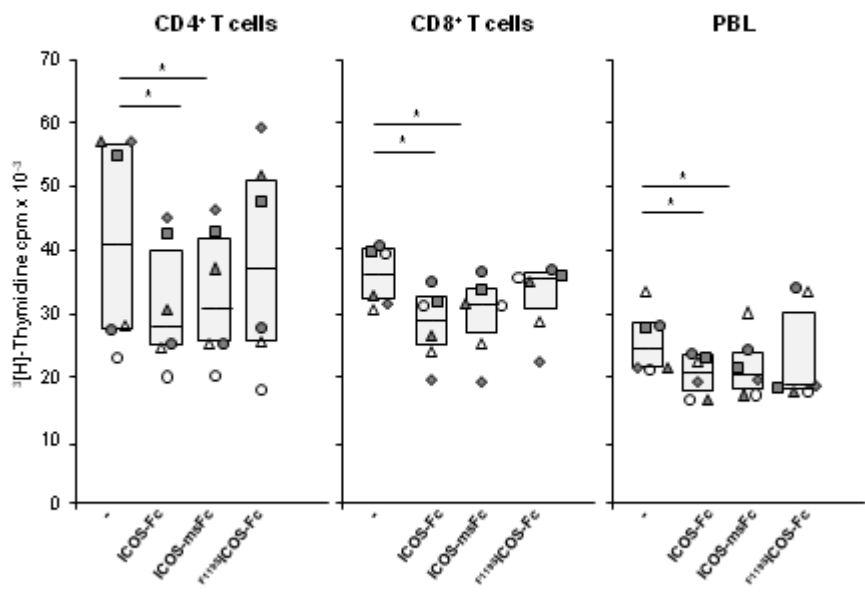
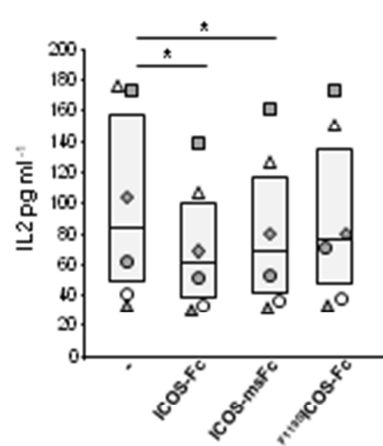
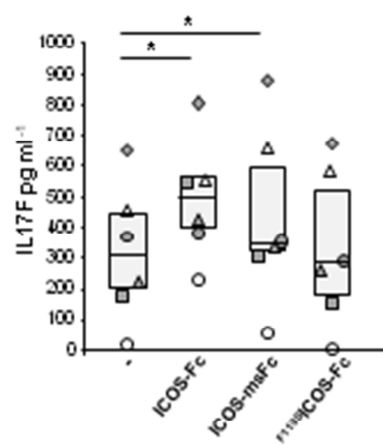
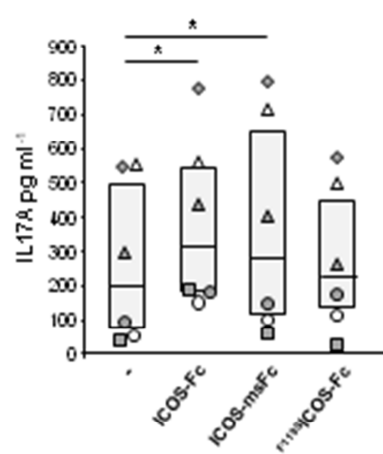


Figure 2

CD4⁺ T cells



PBL

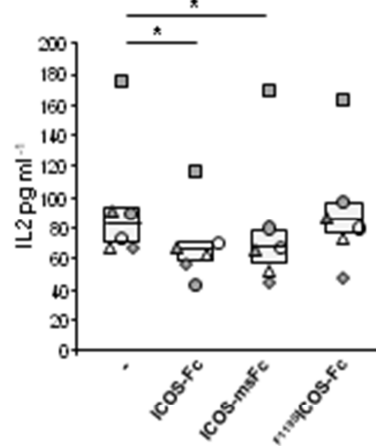
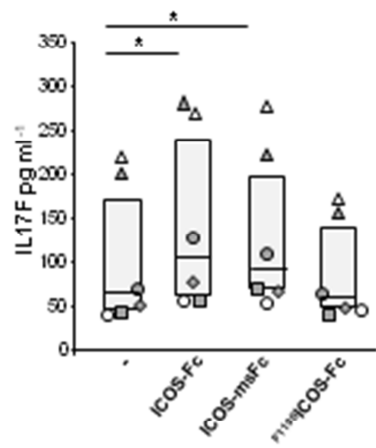
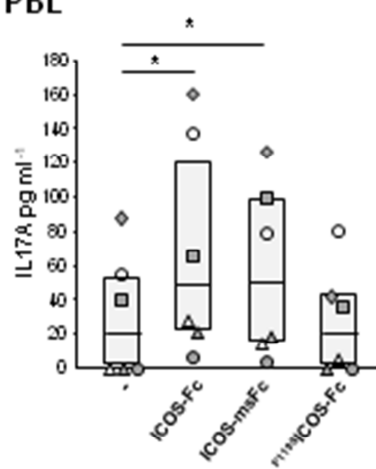


Figure 3

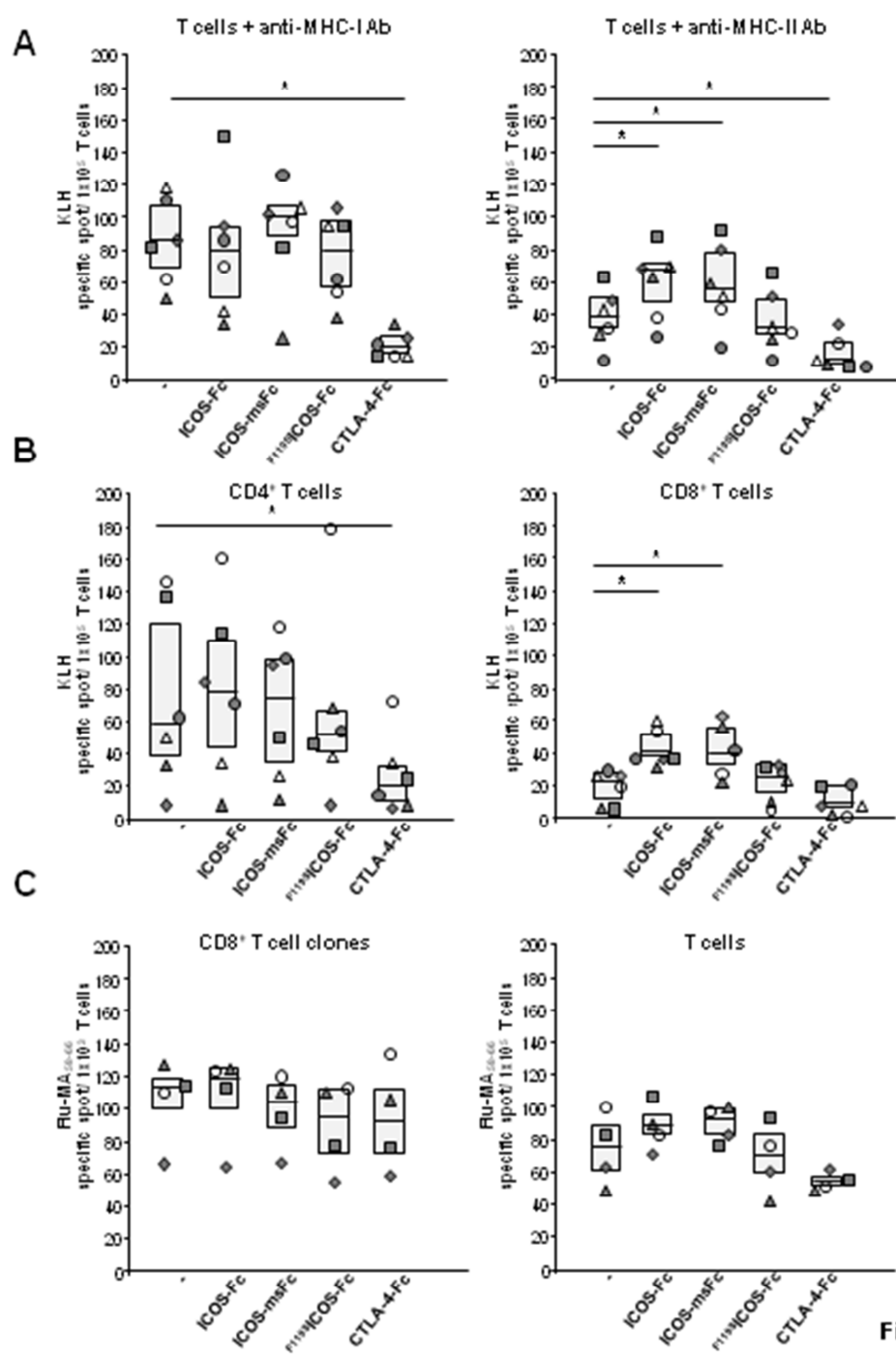


Figure 4

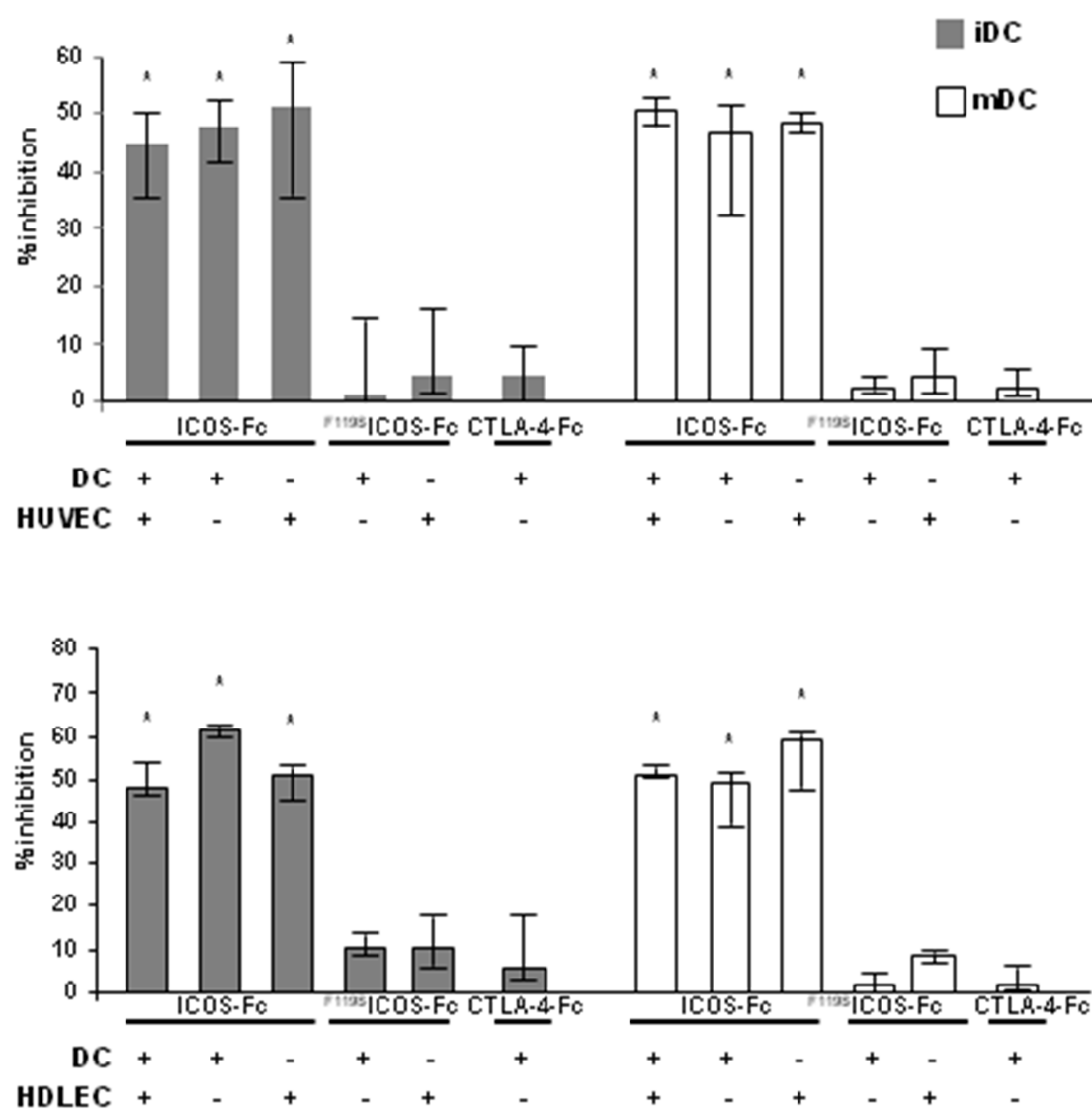


Figure 5

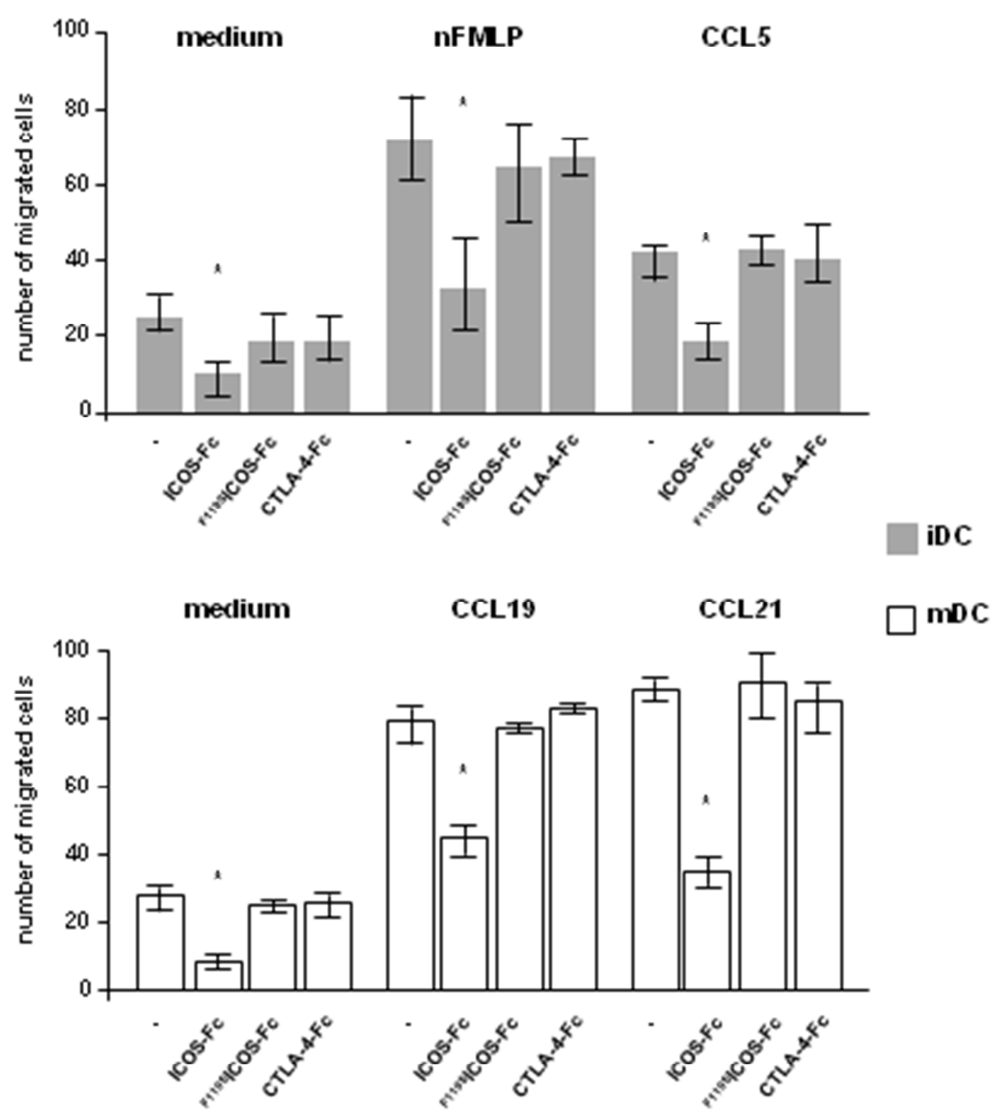


Figure 6

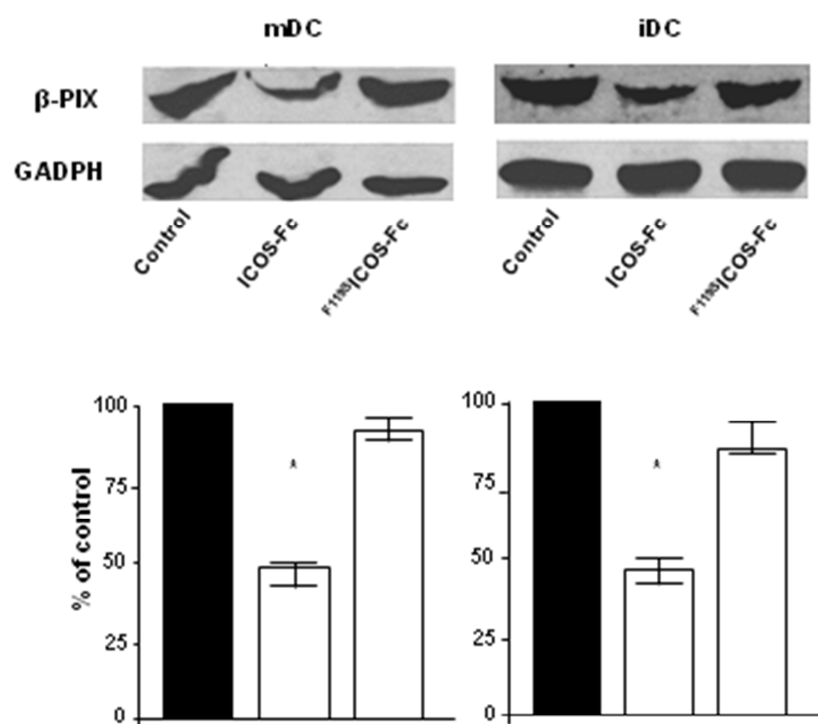


Figure 7

Differential induction of IL-17, IL-10, and IL-9 in human T helper cells by B7h and B7.1.

Riccardo Mesturini^{a,1}, Casimiro L. Gigliotti^{a,1}, Elisabetta Orilieri^a, Giuseppe Cappellano^a, Maria F. Soluri^a, Elena Boggio^a, Abiy Woldetsadik^a, Chiara Dianzani^b, Daniele Sblattero^a, Annalisa Chiocchetti^a, Junji Yagi^c, Josè M. Rojo^d, Umberto Dianzani^{a,*}

^aInterdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD) and Department of Health Sciences, “A. Avogadro” University of Eastern Piedmont, 28100, Novara, Italy

^bDepartment of Science and Pharmaceutical Technology, University of Torino, 10100, Torino, Italy

^cDepartment of Microbiology and Immunology, Tokyo Women's Medical University, 162-8666, Tokyo, Japan

^dDepartment of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, 28040, Madrid, Spain

1 These authors contributed equally to this study.

*Correspondence to: Umberto Dianzani, MD,

Department of Health Sciences, “A. Avogadro” University of Eastern Piedmont, Via Solaroli,17
28100, Novara, Italy. Tel.:+39-0321-660644 Fax:+39-0321-620421, E-mail:
dianzani@med.unipmn.it.

Highlights:

B7h-Fc or B7.1-Fc have different effects on secretion of TH17 and TH9 cytokines in naïve TH cells.

B7h-Fc preferentially induce IL-17A and IL-10, whereas B7.1-Fc is effective on IL-17F and IL-9 too.

The minimal cytokine milieu to induce both TH17 and TH9 cytokines includes TGFβ1+IL-1β.

In the presence of TGFβ1+IL-1β, B7.1-Fc but not by B7h-Fc induces high levels of IL-9.

Abbreviations:

(TH): T helper

(APC): antigen-presenting cells

(TCR): T cell receptor

(mAbs): monoclonal antibody

(PBMC): Peripheral Blood mononuclear cells

(ICOS) Inducible Costimulator

(TGF- β): Transforming Growth Factor- β

(IL-): Interleukine-

(INF- γ): Interferon- γ

(PB): Peripheral Blood

(Ig): Immunoglobulin

Abstract

ICOS and CD28 are expressed by T cells and are involved in costimulation of cytokine production in T helper (TH) cells. ICOS binds B7h expressed by several cell types, whereas CD28 binds B7.1 and B7.2 expressed by activated antigen presenting cells. This work investigated the role of B7h and B7.1 in TH17 and TH9 cell differentiation by assessing activity of recombinant B7h-Fc and B7.1-Fc on human naive TH cells activated in the presence of different combinations of exogenous cytokines. In the presence of TGF- β 1 and IL-1 β (TH17 promoting condition), B7h-Fc was more effective than B7.1-Fc in inducing IL-17A and IL-10 secretion, whereas B7.1-Fc was more effective in inducing IL-17F. Dual costimulation with B7h-Fc and B7.1-Fc displayed an intermediate pattern with predominance of IL-17F over IL-17A, secretion of high levels of IL-10, and secretion of IL-9 levels lower than those induced by B7.1-Fc alone. In the presence of TGF- β 1 and IL-4 (TH9 promoting condition), B7h-Fc induced IL-17A only, whereas B7.1-Fc induced also IL-17F, IL-10, and high levels of IL-9. Experiments on memory TH cells showed that B7h-Fc mainly supported secretion of IL-17A and IL-10, whereas B7.1-Fc supported secretion of IL-17A, IL-17F, IL-10, and IL-9. These data indicate that B7h and B7.1 play different roles in modulation of TH17 and TH9 differentiation. This plasticity might be important in the immune response to pathogens and tumors, and in the development of autoimmune diseases, and should be taken in consideration in designing of immunotherapeutic protocols triggering ICOS or CD28.

Keywords: ICOS, CD28 IL-17, IL-9, TH17, TH9

1. Introduction

Activation and differentiation of naïve T helper (TH) cells requires three signals from antigen-presenting cells (APC). The first is delivered through the T cell receptor (TCR) upon recognition of the antigenic peptide presented by the appropriate MHC molecule, the second by T cell costimulatory molecules engaged by their ligands expressed on APC, and the third by cytokines in the microenvironment [1,2].

The best known TH cell costimulatory molecule is CD28, which is constitutively expressed by all TH cells, binds B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) on APC, and promotes cell proliferation and cytokine secretion [3-5]. Another TH costimulator is ICOS (CD278), which belongs to the CD28 family and is selectively expressed by activated T cells [6-8]. It binds B7h (CD275, B7H2, B7-RP1, ICOSL, GL50) expressed by both haematopoietic and non-haematopoietic cells. B7h is constitutively expressed by B cells, macrophages, and dendritic cells, but it is also expressed by vascular endothelial cells, epithelial cells, and fibroblasts; ICOS-mediated triggering of B7h modulates adhesiveness of vascular endothelial cells to inflammatory and tumor cells [9-10]. This expression pattern suggests that the ICOS:B7h interaction has a role in both T cell activation in lymphoid organs and the control of T cell function at sites of inflammation [11]. In TH cells, ICOS function appears to modulate cytokine secretion by acting on recently activated/memory cells, whereas it is less effective in naïve TH cells, whose activation seems to depend primarily on CD28 costimulation [12-17].

To date, four types of effector TH cells are generally recognized, namely TH1, TH2, TH17, and Treg cells, characterized by secretion of different patterns of cytokines [18]. Under certain circumstances, these patterns may switch from that of one lineage toward another suggesting that TH cells are plastic depending on the inflammatory conditions [19]. Their differentiation from naïve TH cells depends on the cytokine environment during activation, but a role may also be played by the costimulatory receptors delivering the “second signal”. For instance, CD28 costimulation induces secretion of high amounts of IL-2 supporting most types of T cells, whereas

ICOS costimulation is incapable to induce IL-2 but potently induces IL-10 secretion. Moreover, substantial differences have been reported in humans and mice since ICOS triggering induces secretion of high amounts of IL-4 in mice but IFN- γ in humans, which are associated with TH2 and TH1 cells respectively [20-25]. These differences might be partly due to the capacity of the human but not the mouse B7h to weakly interact with CD28 and CTLA4, using binding sites different from that used by ICOS [26].

Recent data showed that ICOS and CD28 may also play a different role in differentiation of TH17 cells, which are involved in the immune response against certain parasites and in some autoimmune diseases [27-30]. In humans, they are characterized by the production of IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, and IL-26 and their differentiation is dependent on the transcription factor retinoic acid-related orphan nuclear receptor C2 (RORC2) [31]. TH17 differentiation is controlled by several cytokines and is inhibited under TH1 and TH2 polarizing conditions, i.e. presence of IFN- γ and IL-4, respectively. In mice, TH17 differentiation requires TGF- β 1 and IL-6, is amplified in an autocrine fashion by IL-21, and is further promoted by IL-23 [32]. In humans, TH17 differentiation involves the same cytokines, but their relative contributions are debated [31, 33-37].

Early reports suggested that both ICOS and CD28 were involved in TH17 differentiation in mice [28, 38]. More recently, studies using ICOS-deficient mice indicated that ICOS was dispensable for TH17 differentiation, but it was necessary for TH17 cells to attain full effector functions [39]. In humans, ICOS was found to be more effective than CD28 in inducing IL-17A and IL-17F secretion in peripheral blood (PB) “memory” TH17 (CCR4⁺CCR6⁺), Treg (CD25⁺CD127^{lo}FoxP3⁺), and TFH (CXCR5⁺CD45RO⁺) cells, but not in TH1 (CXCR3⁺CCR4⁻CCR6⁺) and TH2 (CCR4⁺CXCR3⁻CCR6⁻) cells [40]. Moreover, in long-term cultures, ICOS but not CD28 triggering was capable to support development of TH17 cells from umbilical cord blood naïve TH cells (CD4⁺CD45RA⁺CD25⁻) but only in the presence of a TH17-polarizing milieu containing TGF- β 1, IL-6, IL-1 β , IL-23, and neutralizing antibodies to IFN- γ and IL-4 [40].

TH cells generated under TH17-promoting conditions comprises not only IL-17 secreting cells, but also cells secreting IL-9, exerting its activity on several cell types including T cells, mastcells, eosinophils, and epithelial cells. IL-9 secretion has been initially ascribed to TH2 cells, but recent reports described a distinct subset of TH9 cells characterized by secretion of IL-9 and IL-10, lacking secretion of IFN- γ , IL-4, and IL-17, and involved in development of allergic airway disease and in the response to parasitic infections [19]. However, IL-9 production is not unique to such cells since it may also be expressed by Tregs and TH17 cells [18]. TH9 cell differentiation is supported by CD28 costimulation and requires presence of TGF- β 1 and IL-4, whereas no data are available on the role of ICOS.

This work compared the activity of fusion proteins of the extracellular portion of human B7h or B7.1 fused to the human IgG1 Fc (i.e. B7h-Fc and B7.1-Fc) and dissected the role of the cytokine microenvironment in induction of TH17 and TH9 cytokine secretion in short term cultures of PB naïve TH cells from adult donors. The aim was to provide information helping to understand the variable effects that these reagents have when used as systemic or local immune modulators in vivo. Results showed that B7h-Fc was more effective than CD28 in induction of IL-17A and IL-10, whereas B7.1-Fc was more effective in induction of IL-17F and IL-9. The minimal cytokine microenvironment to obtain these responses was presence of TGF-1 β plus either IL-1 β or IL-4, but IL-6 and IL-21 further supported production of these cytokines.

2. Materials and Methods

2.1. Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by density gradient centrifugation from buffy coat provided by the local Blood Transfusion Service (Novara, Italy). Naïve CD4⁺ T cells were purified by panning to remove CD11b⁺, CD45RO⁺, CD25⁺, CD19⁺, and HLA-DR⁺ cells with the appropriate monoclonal antibody (mAbs), followed by use of the CD4⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) or directly with CD4⁺ T naïve Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec). This approach provided >97% cells displaying the phenotype CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD14⁻CD16⁻, as assessed by direct immunofluorescence and flow cytometry.

CD4⁺CCR6⁺ were purified by using the CD4⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) followed by positive selection with a PE-conjugated anti-CCR6 mAb and anti-PE magnetic beads (Miltenyi Biotec). CD4⁺CD45RO⁺ were purified by using the Memory CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec).

2.2. TH cell differentiation assay

Round-bottom 96-well plates were coated with 100 µl of anti-CD3 mAb (OKT3) overnight at 4°C. To stimulate ICOS or CD28, plates were washed with PBS and further coated with B7h-Fc (5 µg/ml; R&D System), B7.1-Fc (5 µg/mL; R&D System) for 2 hours at room temperature. In some experiments, CD28 was stimulated by treating the anti-CD3 coated wells with polyclonal anti-mouse immunoglobulin (Ig) antibodies (10 µg/ml; Dako Cytomation) followed by anti-CD28 mAb (5 µg/ml; ANC28.1/5D10; Ancell), each for 2 hours at room temperature.

Plates were then washed with PBS and purified naïve CD4⁺ T cells were seeded at 10⁵ cells/well in triplicate in 200 µl of in RPMI 1640 (Gibco) plus 10% FCS, or EX-VIVO 20 Serum Free (Lonza). Where indicated, cultures were performed in the presence of the following recombinant cytokines: IL-1β and IL-4 (10 ng/ml; PeproTech), IL-6 (20 ng/ml; PeproTech), IL-21 (100 ng/ml; Immunotools), IL-23 (20 ng/ml; R&D Systems), and TGF-β1 (5 ng/ml; R&D Systems). To analyze

cytokine secretion, supernatants were collected at day 5 of culture and standard enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were used to evaluate secretion of IL-17A (R&D Systems), IL-17F, IL-17A/F, IL-9 (eBioscience), and IL-10 (Biolegend). To analyze cell proliferation, [³H] thymidine (0.5 μCi/well) was added during the last 6 h of culture; cells were then harvested and [³H] thymidine uptake was evaluated with a β-counter (Perkin Elmer).

2.3. Real-time PCR

Total RNA was extracted and transcribed to cDNA with Cells-to-cDNA II Kit (Ambion) from cells collected at day 5 of culture after re-stimulation with PMA (50 ng/mL, Sigma-Aldrich) plus Ionomycin (1 μg/mL, Sigma-Aldrich) for the last 5h. Transcripts were quantified by real-time PCR on an ABI PRISM 7000 sequence detector (Applied Biosystems) with Applied Biosystems predesigned TaqMan Gene Expression Assays in duplicate for each sample. Relative quantification was performed using the comparative ΔΔCT method.

The following probes were used (Applied Biosystems assay identification numbers in parentheses): IL-17A (Hs00174383_m1), IL-17F (Hs00369400_m1), RORc (Hs01076112_m1), IL-26 (Hs00218189_m1), PU.1 (Hs02786711_m1). For each sample, mRNA abundance was normalized to the amount of ribosomal protein HPRT (Hs99999909_m1).

2.4. Statistical analysis

The non-parametric paired Wilcoxon test was used to compare differences in all experiments. Values of P < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Differential effect of costimulation mediated by B7h-Fc and B7.1-Fc on expression of TH17-related cytokines

To investigate the cytokine milieu necessary to support IL-17A secretion in naïve TH cells, we

analyzed IL-17A secretion induced by B7-Fc in the presence of different combinations of recombinant cytokines. Experiments were performed in the absence of neutralizing antibodies to IL-4 and IFN- γ , often used to increase IL-17 secretion, to allow these cytokines to endogenously influence the cell response. Purified PB naïve TH cells were incubated in serum free medium in wells pre-coated with anti-CD3 mAb in the presence and the absence of B7h-Fc and different combinations of exogenous TGF- β 1, IL-1 β , IL-6, IL-21, and IL-23. The data in figure 1 reveal that IL-17A secretion was always undetectable in the absence of TGF- β 1. In the presence of TGF- β 1, IL-1 β or IL-21 were able to induce IL-17A, with a higher induction observed in the presence of both the exogenous cytokines. In contrast, IL-6 and IL-23 did not induce IL-17A secretion even in the presence of TGF- β 1 and did not increase secretion induced by TGF- β 1+IL-21, but they increased secretion induced by TGF- β 1+IL-1 β (Fig. 1).

Then, we compared the effect of B7h-Fc and B7.1-Fc on IL-17A secretion in PB naïve TH cells and we extended the analysis to IL-17F, the IL-17A/F heterodimer, and IL-10, which can be secreted by TH17 cells. Naïve CD4⁺ T cells were activated with anti-CD3 mAb plus either B7h-Fc or B7.1-Fc and were cultured in the presence or absence of TGF- β 1+IL-1 β together with either IL-6, or IL-21, or IL-23, or the three cytokines combined. ELISA analysis of the culture supernatants showed that B7h-Fc was more efficient than B7.1-Fc in inducing IL-17A (Fig. 2A) and IL-10 (Fig. 2C) secretion in the presence of TGF- β 1+IL-1 β with or without the other cytokines. In B7h-Fc costimulated cells, IL-10 secretion was substantially increased by addition of either IL-6 or IL-21 to the culture medium. Conversely, IL-17F secretion was induced to higher levels by B7.1-Fc than by B7h-Fc provided that TGF- β 1 and IL-1 β were supplemented with at least one of the other cytokines (Fig. 2B). By contrast, secretion of the IL-17A/IL-17F heterodimer was undetectable in all culture conditions (data not shown).

To determine if these effects were manifested at transcriptional level, we evaluated expression of the IL-17A and IL-17F mRNA by real time PCR in cells activated for 5 days using the conditions

above followed by reactivation with PMA+Ionomycin for 5 hours. This analysis was also extended to the IL-26 mRNA which is also expressed by human TH17 cells. IL-17A mRNA analysis (Fig. 3A) was largely in agreement with the protein data since B7h-Fc significantly induced higher levels of IL-17A mRNA than B7.1-Fc in the presence of TGF- β 1+IL-1 β with either IL-6, or IL-21, or IL-23. IL-17F mRNA analysis (Fig. 3B) paralleled the protein data since B7.1-Fc significantly induced higher levels than B7h-Fc under all culture conditions where TGF- β 1+IL-1 β were present. IL-26 mRNA was induced to relatively low levels, but in each case induction was significantly higher with B7.1-Fc than with B7h-Fc. Moreover, the IL-26 mRNA was induced at the highest levels when all recombinant cytokines were present in both B7h- and B7.1-costimulated cells (Fig. 3C).

3.2. Differential effect of B7h-Fc and B7.1-Fc on expression of TH9-related cytokines

Differentiation of TH9 cells requires presence of TGF- β 1+IL-4, but IL-9 secretion can also be induced, at lower levels, in the presence of TGF- β 1+IL-1 β [19]. Therefore, we compared ability of B7h-Fc and B7.1-Fc to induce secretion of IL-9, IL-10, IL-17A, and IL-17F in the presence of either TGF- β 1+IL-1 β or TGF- β 1+IL-4. Moreover, we assessed the effect of the dual costimulation with B7h-Fc+B7.1-Fc in the same conditions to assess the reciprocal interference of the two costimuli. PB naïve CD4⁺ T cells were activated with anti-CD3 mAb plus B7h-Fc and/or B7.1-Fc and cultured with either TGF- β 1+IL-1 β (TH17 promoting conditions) or TGF- β 1+IL-4 (TH9 promoting conditions) in the presence and absence of IL-6+IL-21 supporting both TH17 and TH9 cells [35, 41, 42]. Secretion of IL-17A, IL-17F, IL-10, and IL-9 was then assessed by ELISA in the culture supernatants (Fig. 4).

In the presence of TGF- β 1+IL-4, B7h-Fc induced levels of IL-9 secretion that were similar to those induced by B7.1-Fc. Secretion of IL-17A, IL-17F, and IL-10 induced by B7h-Fc or B7.1-Fc were in line with those shown in the previous experiments. The dual use of B7h-Fc+B7.1-Fc increased secretion of IL-10 and, at a lesser extent, IL17A, but decreased secretion of IL-9 compared with the

effect exerted by either B7h-Fc or B7.1-Fc. Addition of IL-21+IL-6 did not change the pattern of IL-9 secretion, and the effect exerted on secretion of IL-17A, IL-17F, and IL-10 was in line with that shown in the previous experiments. In these conditions, the dual use B7h-Fc+B7.1-Fc induced high secretion of IL-10 and IL-17F, and low secretion of IL-17A similar to those induced by B7.1-Fc, and decreased secretion of IL-9 compared with the effect exerted by either B7h-Fc or B7.1-Fc. In the presence of TGF- β 1+IL-4, B7h-Fc induced secretion of lower levels of IL-9 and IL-10 than B7.1-Fc, whereas IL-17A secretion was similarly induced by each costimulus; dual use of B7h-Fc+B7.1-Fc decreased secretion of IL-9, but increased secretion of IL-10 compared to the effect exerted by B7.1-Fc alone; IL-17F was almost undetectable with any stimulus. When also IL-21+IL-6 were added to the cultures, B7h-Fc still induced secretion of minimal levels of IL-9, IL-10, and IL-17F, but it induced similar levels of IL-17A as B7.1-Fc; by contrast, B7.1-Fc induced substantial levels of all cytokines; dual use of B7h-Fc+B7.1-Fc increased secretion of IL-10 and, at a lesser extent, IL-17A but it decreased secretion of IL-9 and had no effect on secretion of IL-17F compared to the effect exerted by B7.1-Fc alone.

3.3. Induction of the RORC2 and PU.1 transcription factors

The transcription factors RORC2 and PU.1 are involved in differentiation of TH17 and TH9 cells respectively. To further address the effect of B7h-Fc in TH17 and TH9 differentiation, we analyzed its capacity to support expression of *Rorc2* and *PU.1* mRNA in naïve TH cells activated in TH17 and TH9 conditions as described above.

In the presence of TGF- β 1+IL-1 β , B7h-Fc induced similar levels of the *Rorc2* mRNA as B7.1-Fc, and copresence of both costimuli substantially increased these levels. In the further presence of IL-6+IL-21, B7h-Fc induced similar levels of the *Rorc2* mRNA as B7.1-Fc, but copresence of both costimuli decreased these levels (Fig. 5A), which was in line with the decreased IL-17A secretion

detected in this condition (Fig. 4C). By contrast, the *PU.1* mRNA was always barely detectable (data not shown)

In the presence of TGF- β 1+IL-4, both the *Rorc2* and the *PU.1* mRNAs were detectable only in the further presence of IL-6+IL-21. In these conditions, *Rorc2* was induced at higher levels by B7.1-Fc than by B7h-Fc and these levels were substantially increased by costimulation of both receptors (Fig. 5A), which was in line with the increased IL-17A secretion detected in this condition (Fig. 4C); *PU.1* was detectable only using B7.1-Fc (Fig. 5B), which was in line with high IL-9 secretion detected in this condition (Fig. 4C).

3.4. Effect of B7h-Fc and B7.1-Fc in memory T cells

To evaluate the effects of B7h-Fc and B7.1-Fc in memory T cells, we used two T cell preparations: CD4⁺CCR6⁺ T cells which comprise memory TH cells producing IL-17 [43], and CD4⁺CD45RO⁺ TH cells which comprise whole TH memory cells. Cells were activated as described above and cultured with a cytokine cocktail composed of TGF- β 1, IL-6, and IL-21 supplemented with either IL-1 β (TH17 promoting conditions) for CD4⁺CCR6⁺ cells, or IL-4 (TH9 promoting conditions) for CD4⁺CD45RO⁺ cells. Secretion of IL-17A, IL-17F, IL-10, IL-9, and the IL-17A/F heterodimers was then evaluated by ELISA in the supernatants.

In CD4⁺CCR6⁺ cells, B7h-Fc induced higher amounts of IL-10 and lower amounts of IL-17F, IL-17A/F and IL-9 than B7h-Fc. Dual use of B7h-Fc+B7.1-Fc increased secretion of IL-10, whereas secretion of IL-9 was intermediate between those induced by each costimulus alone; secretion of IL-17F and the IL-17A/F heterodimer was similar to that induced by B7.1-Fc. Secretion of IL-17A was induced at similar levels by all costimuli (Fig. 6).

In CD4⁺CD45⁺ T cells, B7.1-Fc induced higher levels of IL-9 and IL-10 than B7h-Fc and these levels were further increased by use of both costimuli. All costimuli induced similar high levels of IL-17-A and minimal levels of IL-17F and IL-17A/F (Fig. 6)

4. Discussion

This work shows that costimulation with B7h-Fc or B7.1-Fc have different effects on secretion of TH17 and TH9 cytokines in naïve TH cells. The overall data indicate that B7h-Fc is more selective than B7.1-Fc since it exerts a preferential effect on IL-17A and IL-10, whereas B7.1-Fc is highly effective on IL-17F and IL-9 too.

In naïve TH cells, the minimal cytokine milieu to induce secretion of both TH17 and TH9 cytokines included TGF β 1+IL-1 β , whose effect was potentiated by a cocktail composed of IL-6 and IL-21. In these conditions, B7h-Fc induced secretion of IL-17A and IL-10 more efficiently than B7.1-Fc, which in turn induced higher secretion of IL-17F and expression of the IL-26 mRNA; by contrast, secretion of IL-9 was similarly induced by the two costimuli. When IL-1 β was substituted with IL-4, the most striking response was the secretion of high levels of IL-9 induced by B7.1-Fc but not by B7h-Fc, which in turn displayed a selective effect in induction of IL-17A. By contrast, B7.1-Fc induced also secretion of IL-10, IL-17A, and low levels of IL-17F.

The different effects displayed by B7h-Fc and B7.1-Fc on IL-17A secretion cannot be ascribed to differential induction of endogenous IL-4 or IFN- γ , since qualitatively similar differences were obtained by activating the cells in the presence of antagonists of these cytokines (data not shown).

Memory TH cells, too, responded differently to B7h-Fc and B7.1-Fc, and B7h-Fc was more selective than B7.1-Fc in inducing cytokine secretion. In CD4⁺CCR6⁺ cells cultured in TH17 promoting conditions, B7h-Fc induced similar levels of IL-17A as B7.1-Fc, but it induced higher levels of IL-10 and lower levels of IL-17F and IL-9 than B7.1-Fc. In CD4⁺CD45RO⁺ cells cultured in TH9 promoting conditions, B7h-Fc induced high levels of IL-17A only, whereas B7.1-Fc induced high levels of IL-9 and IL-10 too.

Dual costimulation with B7h-Fc+B7.1-Fc influenced these patterns in a complex manner and displayed different effects in different cytokine milieus. In most culture conditions, it increased secretion of IL-10 and decreased secretion of IL-9, whereas the effect on secretion of IL-17A was variable in the different conditions.

Secretion of IL-17F was more dependent on the cytokine milieu than that of IL-17A since it required that the minimal milieu, containing either TGF β 1+IL-1 β or TGF β 1+IL-4, was enriched with at least IL-6 and/or IL-21. Moreover, presence of IL-4 substantially decreased secretion of IL-17F in all culture conditions, whereas it had no substantial effect on secretion of IL-17A.

In naïve TH cells, neither B7h-Fc nor B7.1-Fc induced secretion of IL-17A/F heterodimers even when substantial amounts of both IL-17A and IL-17F were induced. In contrast, especially when costimulated with B7.1-Fc, substantial amounts of the heterodimer were produced by “memory” CCR6⁺ TH17 cells. These data suggest that IL-17A and IL-17F were produced by distinct cell subsets in the naïve TH cell cultures, whereas memory TH cells comprised substantial amounts of cells producing both cytokines.

IL-17A and IL-17F are homodimers sharing about 50% sequence identity and several biological activities including the induction of proinflammatory cytokines and antimicrobial peptides, neutrophil recruitment, mucosal immunity against extracellular pathogens, and an involvement in several autoimmune diseases [29, 30]. However, certain features distinguish these two cytokines. Specifically, the ability to upregulate transcription factors and proinflammatory molecules appears lower for IL-17F than for IL-17A. Furthermore, IL-17A but not IL-17F appears to play a role in development of collagen-induced arthritis, contact hypersensitivity, and delayed-type hypersensitivity [44]. In the mouse model of OVA-alum induced asthma, IL-17A promotes the TH2 response, whereas IL-17F has a regulatory role in restricting allergic asthma development. In contrast, in dextran sulfate sodium-induced colitis, IL-17A played a protective role, whereas IL-17F appeared to exacerbate the intestinal inflammation. In multiple sclerosis lesions, IL-17A but not IL-17F was detected [45]. Finally, in gastric adenocarcinoma, IL-17A induced activation of MAPK, AP-1, and NF- κ B, and secretion of high amounts of IL-8, whereas IL-17F induced activation of NF- κ B alone and secretion of low amounts of IL-8 [45]. IL-17 receptor usage, too, has been reported to be partly different since IL-17A seemed to preferentially interact with IL-17RA, whereas IL-17F with IL-17RC [46]. Plasmon resonance experiments showed that IL-17A, IL-17F,

and IL-17A/F heterodimers bound to IL-17RC with comparable affinities, but with different affinities to IL-17RA where the affinity for IL-17A highest, IL-17F lowest, and intermediate for the heterodimer. Moreover, biological activity of IL-17A was primarily inhibited by soluble IL-17RA, IL-17F by soluble IL-17RC, and IL17A/F heterodimer by both receptors [47].

Paulos et al. [40] reported that ICOS triggering is a potent inducer of IL-17A secretion in umbilical cord blood naïve TH cells in the presence of a TH17-polarizing milieu containing IL-1 β , IL-6, IL-23, neutralizing antibodies to IFN- γ and IL-4. By contrast, triggering of CD28 and dual costimulation of CD28+ICOS were poorly effective in inducing IL17A secretion. Moreover, IL-10 secretion was induced at comparable levels by each costimulus. The inconsistencies with our results may partly depend on the different TH cell source since naïve cord blood TH cells include high proportions of recent thymic emigrant cells, which may influence the response and are rare in adult PBMC [48]; moreover, their stimulation protocols were different from ours since they triggered CD28 and ICOS by means of either mAb or cells transfected with the costimulatory ligands and expanded cells in long term (15 days) cultures using serum-containing medium.

Both CD28 and ICOS signaling uses PI3K but their different signaling outcomes may be due to the ability of CD28, but not ICOS, to bind the Grb-2/GADS adaptor proteins and the Itk and Lck kinases, and their differential usage of PI3K subunits [49]. Moreover, ICOS costimulation has been reported to induce higher levels of NFATc1 than CD28 costimulation [21] which is intriguing at the light of the notion that NFATc1 activity is involved in induction of IL-17A, but not IL-17F [50].

5. Conclusions

The overall data suggest that costimulation mediated by B7.1 triggers distinct effector functions depending on the cytokine microenvironment, i.e. it induces IL-17F secreting cells in the presence of TGF β 1+IL-1 β , and IL-9 secreting cells in the presence of TGF β 1+IL-4. By contrast, costimulation mediated by B7h is generally biased toward induction of IL-17A secreting cells and supports cell plasticity by favouring contemporary secretion of IL-10, which substantially

modulates TH17 cell function [51]. IL-10 can be produced by several cell types, including TH1 and TH17 cells, where it negatively regulates their function and can be induced by strong TCR stimulation leading to sustained Erk activation [18]. This suggests that IL-10 serves to control the magnitude of many types of immune responses and to prevent tissue damage. This plasticity might be important in the immune response to pathogens and tumors, and in the development of autoimmune diseases, and should be taken in consideration in designing of immunotherapeutic protocols triggering ICOS and/or CD28.

Acknowledgments

This work was supported by Associazione Italiana Ricerca sul Cancro (Milan), Fondazione Cariplo (Milan), Regione Piemonte (Ricerca Sanitaria Finalizzata and Piattaforme Innovative), Fondazione Italiana Sclerosi Multipla 2008/R/711 (Genoa), Fondazione Amici di Jean (Torino).

Conflict of Interest Statement

The authors have no financial conflict of interest.

References

- [1] Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA, Patel B, Koons A, Qin HY, et al. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233–58.
- [2] Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003;21:305–34.
- [3] Chambers CA, Allison JP. Costimulatory regulation of T cell function. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:203–10.
- [4] Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197–216.
- [5] Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005;23:515–48.
- [6] Buonfiglio D, Bragardo M, Redoglia V, Vaschetto R, Bottarel F, Bonissoni S, et al. The T cell activation molecule H4 and the CD28-like molecule ICOS are identical. *Eur J Immunol* 2000; 30:3463-7.
- [7] Redoglia V, Dianzani U, Rojo JM, Portolés P, Bragardo M, Wolff H, et al. Characterization of H4: a mouse T lymphocyte activation molecule functionally associated with the CD3/T cell receptor. *Eur J Immunol* 1996;26:2781-9.
- [8] Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999;397:263–6.
- [9] Swallow MM, Wallin JJ, Sha WC. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNF α . *Immunity* 1999;11:423–32.
- [10] Dianzani C, Minelli R, Mesturini R, Chiocchetti A, Barrera G, Boscolo S, et al. B7h triggering inhibits umbilical vascular endothelial cell adhesiveness to tumor cell lines and polymorphonuclear cells. *J Immunol* 2010;185:3970-9.

- [11] Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, et al. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 1999;402:827–32.
- [12] Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle N, et al. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T cell activation and function. *Nature* 2001;409:97–101.
- [13] Tafuri A, Shahinian A, Bladt F, Yoshinaga SK, Jordana M, Wakeham A, et al. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 2001;409:105–9.
- [14] McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, et al. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 2001;409:102–5.
- [15] Ling V, Wu PW, Finnerty HF, Bean KM, Spaulding V, Fouser LA, et al. Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *J Immunol* 2000;164:1653–7.
- [16] Wang S, Zhu G, Chapoval AI, Dong H, Tamada K, Ni J, et al. Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood* 2000;96:2808–13.
- [17] Nurieva RI, Mai XM, Forbush K, Bevan MJ, Dong C. B7h is required for T cell activation, differentiation, and effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:14163–8.
- [18] Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 2010;20:4–12.
- [19] Stassen M, Schmitt E, Bopp T. From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Ann NY Acad Sci* 2012;1247:56–68.
- [20] Yagi J, Arimura Y, Dianzani U, Uede T, Okamoto T, Uchiyama T. Regulatory roles of IL-2 and IL-4 in H4/inducible costimulator expression on activated CD4⁺ T cells during TH cell development. *J Immunol* 2003;171:783–94.
- [21] Nurieva RI, Duong J, Kishikawa H, Dianzani U, Rojo JM, Ho I, et al. Transcriptional regulation of TH2 differentiation by inducible costimulator. *Immunity* 2003;18:801–11.

- [22] Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, et al. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 2002;8:1024–32.
- [23] Wassink L, Vieira PL, Smits HH, Kingsbury GA, Coyle AJ, Kapsenberg ML, et al. ICOS expression by activated human TH cells is enhanced by IL-12 and IL-23: increased ICOS expression enhances the effector function of both TH1 and TH2 cells. *J Immunol* 2004;173:1779–86.
- [24] Vieira PL, Wassink L, Smith L, Nam S, Kingsbury GA, Gutierrez-Ramos JC, et al. ICOS-mediated signaling regulates cytokine production by human T cells and provides a unique signal to selectively control the clonal expansion of TH2 helper cells. *Eur J Immunol* 2004;34: 1282–90.
- [25] Mesturini R, Nicola S, Chiocchetti A, Bernardone IS, Castelli L, Bensi T, et al. ICOS cooperates with CD28, IL-2, and IFN-gamma and modulates activation of human naïve CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 2006;36:2601–12.
- [26] Yao S, Zhu Y, Zhu G, et al. B7-h2 is a costimulatory ligand for CD28 in human. *Immunity* 2011;34:729-40.
- [27] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin-17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123–32.
- [28] Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin-17. *Nat Immunol* 2005;6: 1133–41.
- [29] van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Kullberg BJ, van der Meer JW, Joosten LA, Netea MG. TH17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB Rep.* 2009;42:776–87.

- [30] Sallusto F, Lanzavecchia A. Human TH17 cells in infection and autoimmunity. *Microbes Infect* 2009;11:620–4.
- [31] Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human TH17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t. *Nat Immunol* 2008;9:641–9.
- [32] Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 2008;8:337–48.
- [33] Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007;8:942–9.
- [34] Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007;8:950–7.
- [35] Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-21 and TGF- β are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 2008;454:350–2.
- [36] Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, et al. A critical function for transforming growth factor- β , interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* 2008;9:650–7.
- [37] Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. The phenotype of human TH17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of TH17 cells in inflammation. *Int Immunol* 2008;20:1361–8.
- [38] Nurieva RI. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS-B7h interaction. *Clin Immunol* 2005;115:19–25.

- [39] Bauquet AT, Jin H, Paterson AM, Mitsdoerffer M, Ho IC, Sharpe AH, et al. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol* 2009;10:167–75.
- [40] Paulos CM, Carpenito C, Plesa G, Suhoski MM, Varela-Rohena A, Golovina TN, et al. The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human T(H)17 cells. *Sci Transl Med* 2010;27:55ra-78.
- [41] Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007;8:967-74.
- [42] Putheti P, Awasthi A, Popola J, Gao W, Strom TB. Human CD4 memory T cells can become CD4+ IL-9+ T cells. *PLoS One* 2010;5:e8706.
- [43] Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007;8:639–46.
- [44] Haines CJ, Giffon TD, Lu LS, Lu X, Tessier-Lavigne M, Ross DT, et al. Human CD4+ T cell recent thymic emigrants are identified by protein tyrosine kinase and have reduced immune function. *J Exp Med* 2009;206:275-85.
- [45] Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, et al. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity* 2009;30:108–19.
- [46] Chang SH, Dong C. IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation. *Cytokine* 2009;46:7–11.
- [47] Kuestner RE, Taft DW, Haran A, Brandt CS, Brender T, Lum K, et al. Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F. *J Immunol* 2007; 179:5462–73.

- [48] Wright JF, Bennett F, Li B, Brooks J, Luxenberg DP, Whitters MJ, et al. The human IL-17F/IL-17A heterodimeric cytokine signals through the IL-17RA/IL-17RC receptor complex. *J Immunol* 2008;181:2799–805.
- [49] Acosta YY, Zafra MP, Ojeda G, Bernardone IS, Dianzani U, Portolés P, et al. Biased binding of class IA phosphatidylinositol 3-kinase subunits to inducible costimulator (CD278). *Cell Mol Life Sci* 2011;68:3065-79.
- [50] Gomez-Rodriguez J, Sahu N, Handon R, Davidson TS, Anderson SM, Kirby MR, et al. Differential expression of interleukin-17A and -17F is coupled to T cell receptor signaling via inducible T cell kinase. *Immunity* 2009;31:587–97.
- [51] McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 2007;8:1390–7.

Figure Captions

Fig. 1. IL-17A secretion promoted by naïve CD4⁺ T cells. Naïve CD4⁺ T cells were activated in the presence or absence of different combinations of cytokines with anti-CD3 mAb plus B7h-Fc in Serum Free medium with and without recombinant TGF-β1. IL-17A secretion was measured by ELISA in the culture supernatant at day 5. Results are from one representative experiment out of five experiments and are expressed as means±SD from triplicate cultures. Statistical analysis was performed on the data from the five experiments using the Wilcoxon paired test; (*) marks significant differences (p<0.05) between cells grown in the presence and absence of TGF-β1 in each cytokine milieu; (#) marks significant differences between ICOS-costimulated cells grown in the presence of TGF-β1+IL-1β and those grown in the presence of other cytokine milieus.

Fig. 2. Secretion of IL-17A, IL-17F, and IL-10 induced in naïve CD4⁺ T cells by costimulation with B7h-Fc or B7.1-Fc. Naïve CD4⁺ T cells were stimulated with anti-CD3 plus either B7h-Fc or B7.1-Fc in the presence of different combinations of TGF-β1, IL-1β, IL-6, IL-21, and IL-23. Secretion of IL-17A (**A**), IL-10 (**B**) and IL-17F (**C**) was assessed by ELISA in the supernatants at day 5; data are from one representative experiment out of nine experiments and are expressed as means±SD from triplicate cultures. Statistical analysis was performed on the data from the total experiments using the Wilcoxon paired test; (*) marks significant differences (p<0.05) between B7h-Fc and B7.1-Fc costimulated cells in each cytokine milieu.

Fig. 3. Expression of the IL-17A, IL-17F, and IL-26 mRNA induced in naïve CD4⁺ T cells by costimulation with B7h-Fc or B7.1-Fc. Naïve CD4⁺ T cells were stimulated as in Figure 2 and mRNA encoding for IL-17A (**A**), IL-17F (**B**), and IL-26 (**C**) was evaluated by real time PCR at day 5 after re-stimulation with PMA/Ionomycin for the last 5 hours; cycling threshold values were normalized to those of mRNA encoding HPRT, and expression detected in B7.1-Fc-treated cells was set as 1.0; data are from one representative experiment out of six experiments. Statistical

analysis was performed on the data from the total experiments using the Wilcoxon paired test; (*) marks significant differences ($p < 0.05$) between B7h-Fc and B7.1-Fc costimulated cells in each cytokine milieu.

Fig. 4. Expression of IL-9, IL-10, IL-17A, and IL-17F induced in naïve CD4⁺ T cells by costimulation with B7h-Fc and/or B7.1-Fc in TH17- and TH9-promoting conditions. Naïve CD4⁺ T cells were stimulated with anti-CD3 plus either B7h-Fc and/or B7.1-Fc in the presence of different combinations of TGF- β 1, IL-1 β or IL-4, IL-6, and IL-21. Cytokine secretion was evaluated by ELISA after 5 days of culture. Results are from one of six representative experiments, error bars indicate the SD from triplicate culture; (*) mark significant differences from costimulation of B7h-Fc alone; (#) mark significant differences from costimulation of B7.1-Fc alone.

Fig. 5. *Rorc2* and *Rora* mRNA expression induced by naïve T cell costimulation with B7h-Fc or B7.1-Fc. Experiments were performed as in Figure 3 and levels of mRNA encoding for RORC2 and PU.1 were evaluated by real time PCR. Data are from one representative experiment out of six experiments. Statistical analysis was performed on the data from the total experiments using the Wilcoxon paired test; (*) mark significant differences from costimulation of B7h-Fc alone; (#) mark significant differences from costimulation of B7.1-Fc alone.

Fig. 6. Secretion of IL-17A, IL-17F, IL-17A/F, and IL-10 induced in “memory” TH cells by costimulation with B7h-Fc or B7.1-Fc. “Memory” CD4⁺CCR6⁺ T cells were stimulated as in Figure 3 in the presence and absence of a cytokine cocktail of TGF- β 1, IL-1 β , IL-6, IL-21, and IL-23; secretion of IL-17A (**A**), IL-17F (**B**), IL-17A/F (**C**), and IL-10 (**D**) was assessed by ELISA in the supernatants at day 5. Data are from one representative experiment out of five experiments. Statistical analysis was performed on the data from the total experiments using the Wilcoxon paired test; (*) mark significant differences from costimulation of B7h-Fc alone; (#) mark significant differences from costimulation of B7.1-Fc alone.

Fig. 1

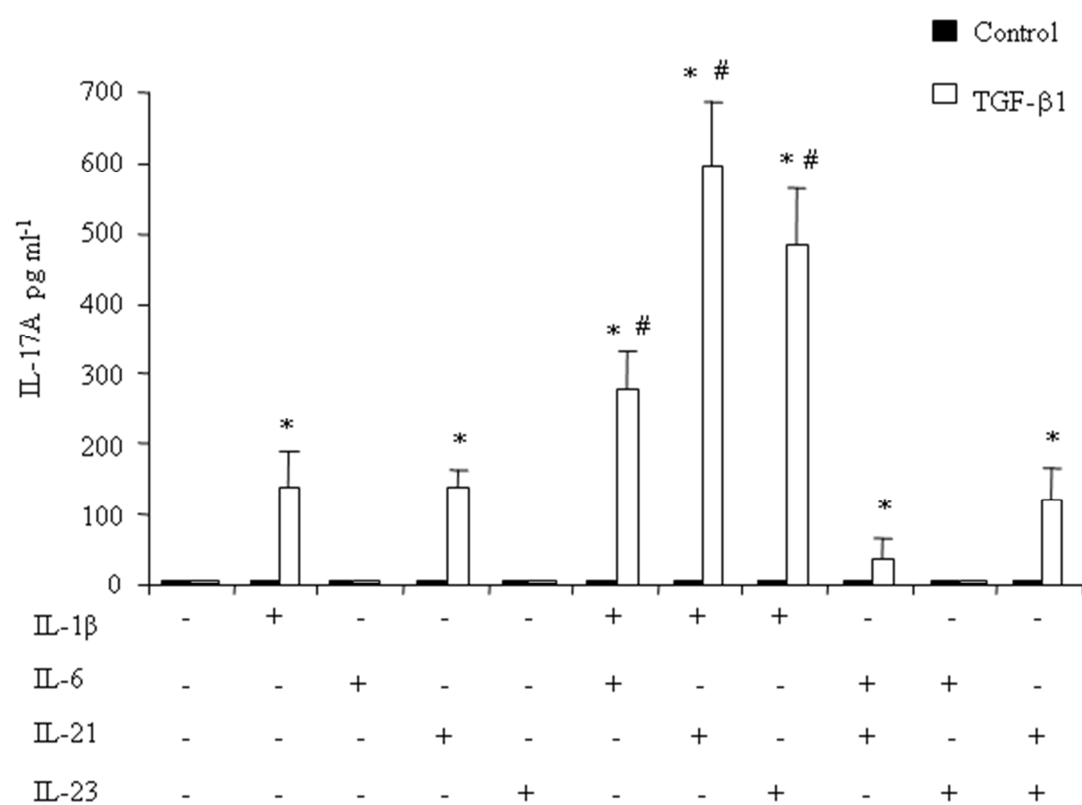


Fig. 2

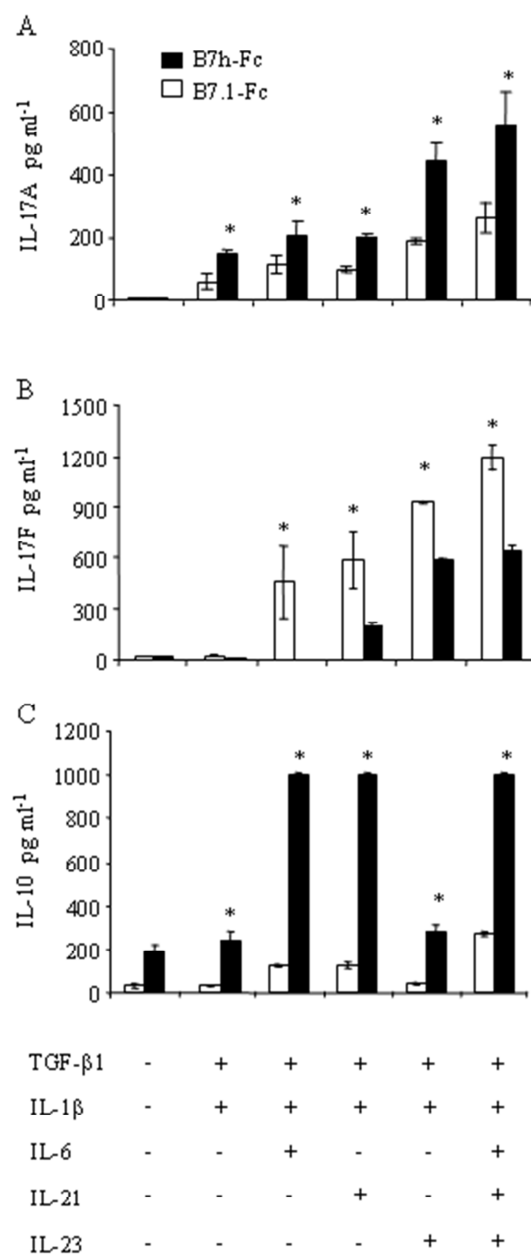


Fig. 3

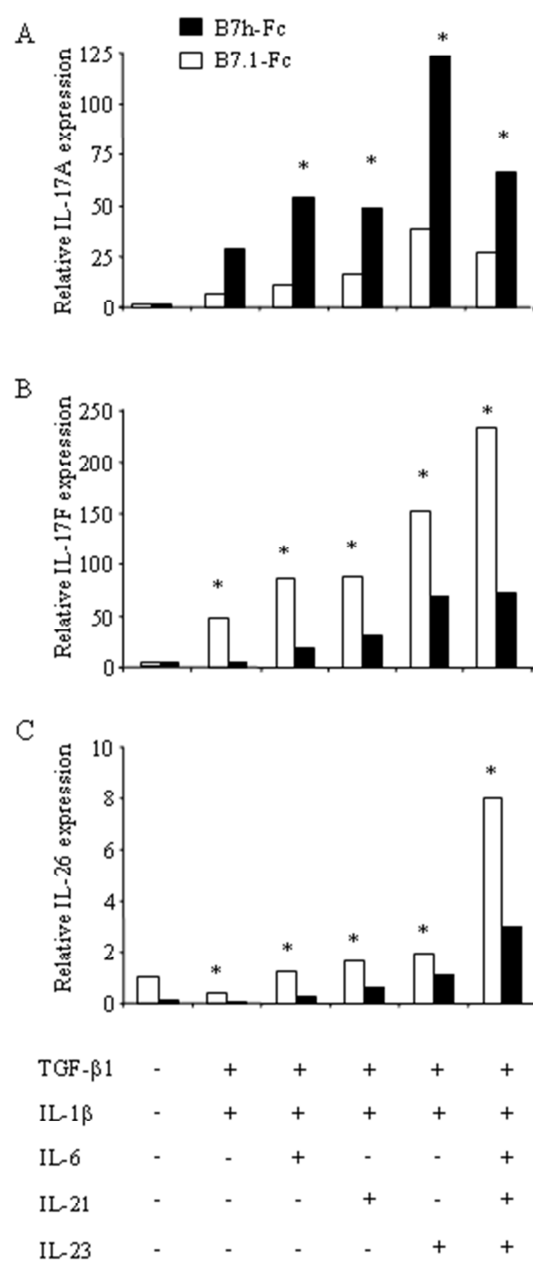


Fig. 4

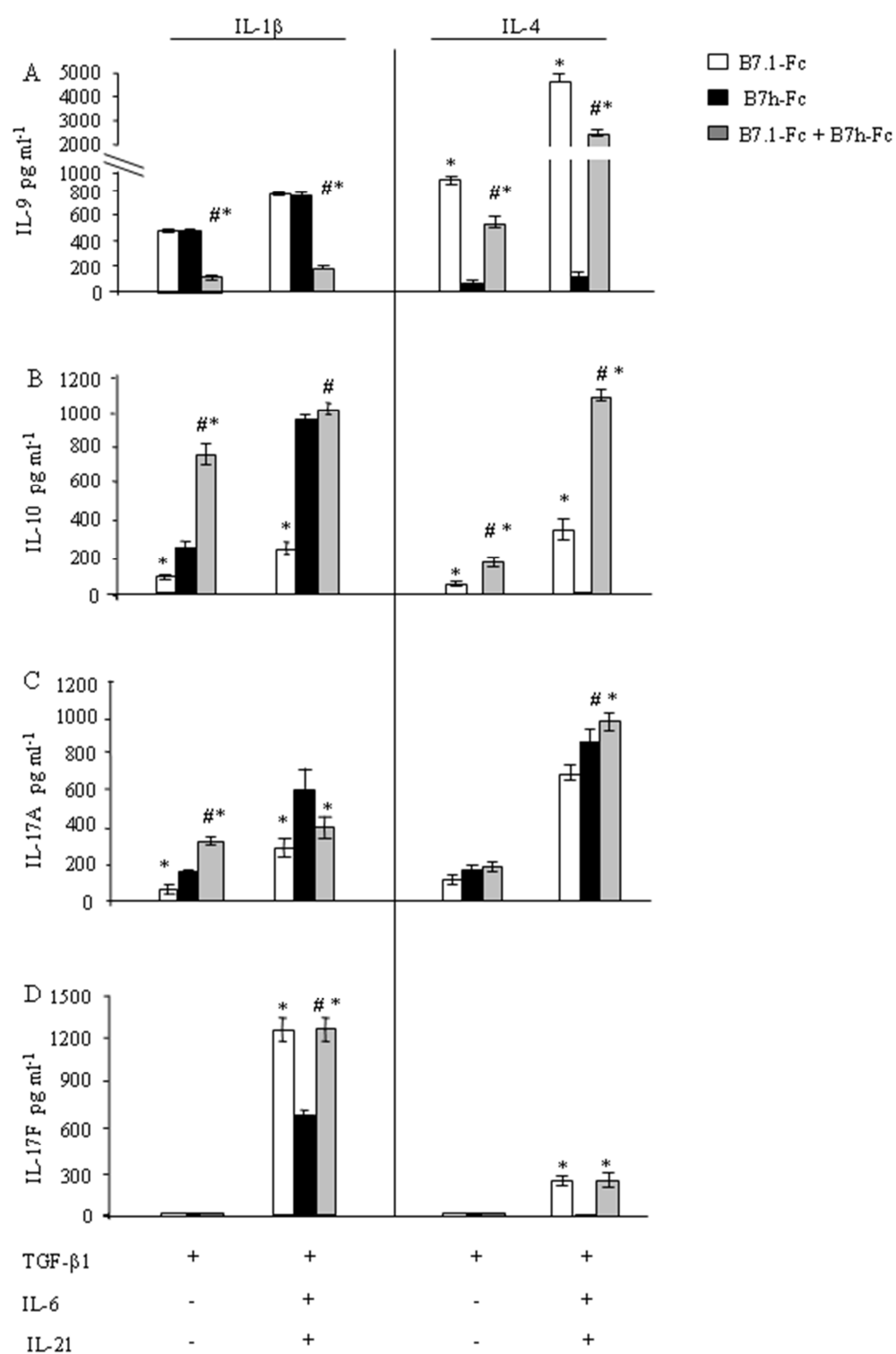
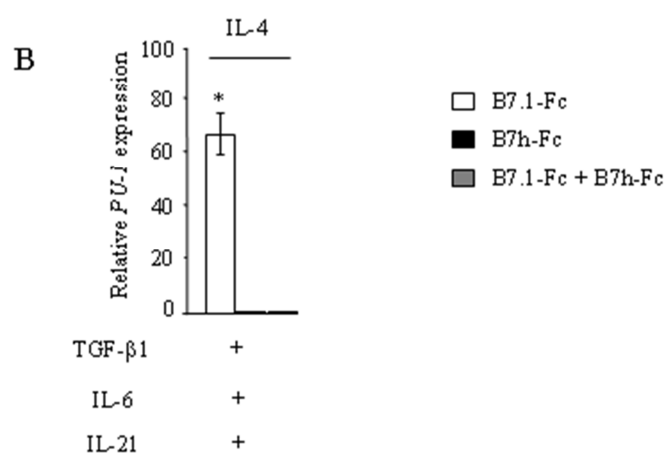
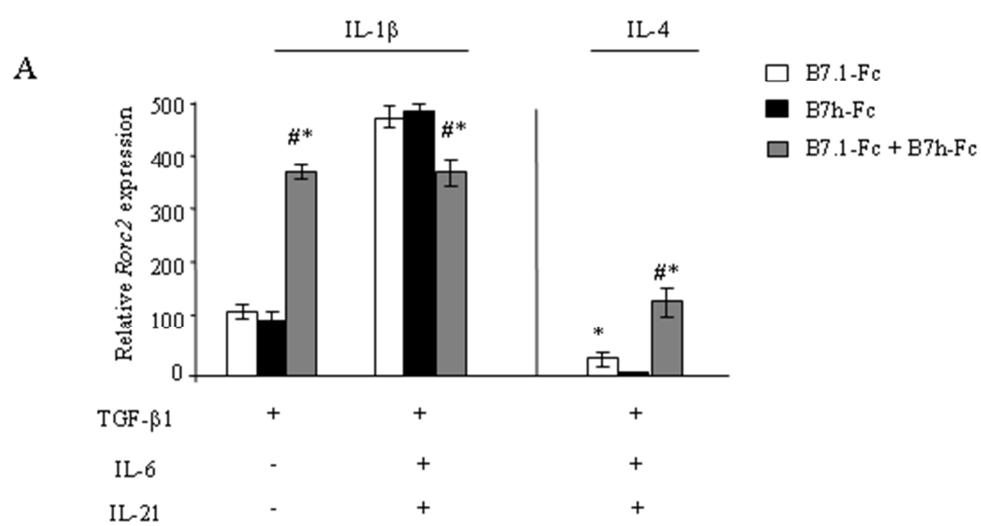


Fig. 5



Variations of the *UNC13D* gene in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome

Maurizio Aricò,¹ Elena Boggio,^{2,3} Valentina Cetica,¹ Matteo Melensi,^{2,3} Elisabetta Orilieri,^{2,3} Nausicaa Clemente,^{2,3} Giuseppe Cappellano,^{2,3} Sara Buttini,^{2,4} Maria Felicia Soluri,^{2,3} Cristoforo Comi,^{2,4} Carlo Dufour,⁵ Daniela Pende,⁶ Irma Dianzani,^{2,3} Steven R. Ellis,⁷ Sara Pagliano,⁸ Stefania Marcenaro,⁶ Ugo Ramenghi,⁸ Annalisa Chiocchetti ^{2,3} and Umberto Dianzani ^{2,3}

1 Department of Pediatric Hematology Oncology, Meyer Children Hospital, Firenze, Italy, **2** Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD), "A. Avogadro" University of Eastern Piedmont, Novara, Italy, **3** Department of Health Sciences, "A. Avogadro" University of Eastern Piedmont, Novara, Italy, **4** Department of Translational Medicine, "A. Avogadro" University of Eastern Piedmont, Novara, Italy, **5** Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy, **6** National Institute of Cancer Research (IST), Genova, Italy, **7** Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Louisville, Louisville, Kentucky, USA, and **8** Department of Pediatrics, University of Torino, Torino, Italy

Corresponding Author: Annalisa Chiocchetti MD, PhD, Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD) and Department of Health Sciences, "A. Avogadro" University of Eastern Piedmont, via Solaroli 17, I-28100 Novara, Italy; email: annalisa.chiocchetti@med.unipmn.it [Phone:+390321660668](tel:+390321660668), Fax:+390321620421.

Abstract

Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) is caused by genetic defects decreasing Fas function and is characterized by lymphadenopathy/splenomegaly and expansion of CD4/CD8 double-negative T cells. This latter expansion is absent in the ALPS variant named Diansani Autoimmune/Lymphoproliferative Disease (DALD). In addition to the causative mutations, the genetic background influences ALPS and DALD development. We previously suggested a disease-modifying role for the perforin gene involved in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL). The *UNC13D* gene codes for Munc13-4 which is involved in perforin secretion and FHL development and thus another candidate for a disease-modifying role in ALPS and DALD. In this work, we sequenced *UNC13D* in 21 ALPS and 20 DALD patients and compared these results with sequences obtained from 61 healthy subjects and 38 multiple sclerosis (MS) patients. We detected four rare missense variations in three heterozygous ALPS patients carrying p.Cys112Ser, p.Val781Ile, and a haplotype comprising both p.Ile848Leu and p.Ala995Pro. Transfection of the mutant cDNAs in HMC-1 cells showed that they decreased granule exocytosis compared to the wild-type construct. A further rare missense variation, p.Pro271Ser, was detected in a healthy subject, but it did not decrease Munc13-4 function. These data suggest that rare loss-of-function variations of *UNC13D* are risk factors for ALPS development.

Keywords: MUNC13-4, Autoimmunity, Lymphoproliferation, FHL, Fas

Introduction

Cells expressing Fas/Apo-1 (CD95), a ubiquitous death receptor, undergo apoptosis upon interaction with Fas ligand (FasL) [1,2]. Deleterious mutations in the Fas gene (*FAS*) give rise to the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS), characterized by lymphadenomegaly and/or splenomegaly due to polyclonal accumulation of lymphocytes, and peripheral expansion of CD4/CD8 double-negative (DN) T cells [3,4,5,6,7,8]. In addition, patients often display autoimmune manifestations that predominantly involve blood cells. The underlying pathophysiology of ALPS resides in the role of Fas/FasL interaction in the T cell response. The Fas/FasL interaction does not induce apoptosis in resting and recently activated T-cells, but instead induces apoptosis several days after cell activation. This delayed induction of apoptosis is involved in shutting-off immune responses, lymphocyte lifespan regulation, and maintenance of peripheral tolerance.

In addition to mutations in *FAS*, a small number of ALPS patients have been shown to have mutations in the genes encoding FasL (*FASL*) or caspase-10 (*CASP10*), a downstream effector in the Fas/FasL pathway. As a substantial proportion of ALPS patients lack mutations in *FAS*, *FASL*, and *CASP10*, it seems likely that mutations in unknown genes encoding other downstream components of the Fas cell death pathway may give rise to the other ALPS cases [7,8]. We have also described an incomplete form of ALPS showing defective Fas function, autoimmunity, and lymphoproliferation, but lacking the expansion of DN T cells. This variant form has been named Diansani Autoimmune Lymphoproliferative Disease (DALD) by Victor McKusick (OMIM #605233) [8,9,10,11]. Patients with DALD did not display mutations in *FAS*, *FASL*, or *CASP10*, but most of the parents displayed a defect in the Fas pathway. These data suggest that mutations in genes encoding downstream effectors of the Fas pathway may also give rise to DALD.

In addition to the Fas defect, the clinical presentation of ALPS also appears to be influenced by modifier genes. In mice, a disease displaying features of ALPS has been reported for MRL *lpr/lpr* and *gld/gld* mice, carrying mutations of *FAS* and *FASL*, respectively. Disease presentation in these mice is dramatically affected by strain background, with strains other than MRL showing much milder phenotypes when homozygous for either *lpr* or *gld* mutations [1,12]. These background effects likely explain the incomplete penetrance of ALPS mutations in humans [13]. Most ALPS patients are heterozygous for the *FAS* mutation, but parents carrying the same mutation are generally healthy. The same observation is true in DALD, where parents typically display defective Fas function, but are otherwise healthy [10,11]. This observation indicates that mutations in genes of the Fas pathway may be necessary but not sufficient for ALPS development and variations in one or more additional genes may influence disease presentation [7].

In addition to the autoimmune component of ALPS, individuals with this disorder are also predisposed to lymphomas in adulthood [14]. The predisposition to lymphoma may be a consequence of lymphocyte accumulation and defective cytotoxic actions of cytotoxic T lymphocytes (CTL) and natural killer (NK) cells, using the Fas/FasL system as a cytotoxic weapon. In previous studies, we suggested that variations in other genes involved in the cytotoxicity of CTL and NK cells may influence ALPS/DALD presentation, since we correlated certain variants of the perforin gene (*PRF1*) with ALPS/DALD susceptibility [15,16]. Perforin is stored in the lytic granules of CTL and NK cells and plays a crucial role in cell-mediated cytotoxicity by forming pores in the target cell membrane [17]. Perforin deficiency is responsible for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL), an autosomal recessive disease characterized by bouts of prolonged fever, hepatosplenomegaly, and cytopenia due to defective function of CTL and NK cells. In patients with FHL, defective clearance of virus-infected cells may be responsible for cytokine and effector cell overproduction with massive tissue damage [18]. Fas function is normal in FHL and hence is not a contributing factor of this disease [19]. Since the perforin variations that influenced ALPS/DALD susceptibility might affect cytotoxicity of CTL and NK cells, we reasoned that other proteins functioning in this or related pathways may also influence ALPS/DALD presentation. Approximately 40% of FHL cases are due to mutations of *PRF1* (FHL2) with another 40% due to mutations of *UNC13D* (FHL3) which encodes Munc13-4, another component of the cytotoxic machinery. A small number of patients with FHL have been found to harbor mutations of *STX11* (FHL4) or *STXBP2* (FHL5), which code for syntaxin-11 and Munc18-2, respectively. These proteins are thought to participate in the transport, membrane fusion, or exocytosis of perforin-containing lytic granules [20].

The aim of this work was to analyse the *UNC13D* gene for variations in ALPS and DALD patients to assess its potential role as a disease-modifier gene. We found that loss-of-function variations of *UNC13D* are relatively frequent in patients with ALPS suggesting that it may have a role influencing the presentation of this lymphoproliferative disorder.

Materials and methods

Patients

We analysed 41 unrelated Italian patients, 21 with ALPS and 20 with DALD. All patients were diagnosed at the Paediatric Department of the University of Turin using criteria established at the 2009 ALPS NIH International Workshop [8]. *FAS* (NCBI ID: 355) and *CASP10* (ID: 843) were sequenced in all patients as reported previously [9,10]. Among the ALPS patients, seven carried heterozygous mutations of *FAS* (ALPS-FAS), fourteen did not carry any known mutation (ALPS-U). Fas function was evaluated in all ALPS and DALD patients and the available parents as previously reported [9,10]. Briefly, activated T-cells were treated with anti-Fas mAb (CH11, 1µg/ml) and survival was assessed after 18 hr. Results were expressed as specific cell survival %. The upper limit of the normal range was calculated as the 95th percentile of data obtained from 150 healthy controls; two or more were run in each experiment as positive controls. None of the patients fulfilled the diagnostic criteria for FHL. The total of 61 healthy individuals were used as controls for *UND13D* sequencing; a second cohort of 100 healthy controls were used to genotype the rare variations. Moreover, *UNC13D* was sequenced in 38 patients with Multiple Sclerosis (MS) from the MS Center of the "Amedeo Avogadro" University of Eastern Piedmont (Novara). The study was planned according to the guidelines of the local ethical committee "Azienda Ospedaliera della Carità" di Novara that approved the study (Protocol 106/CE). For the patients followed at Paediatric Department of the University of Torino, a written informed consent was signed by the patients or by the parents if they were minors.

UNC13D sequencing

Genomic DNA was isolated from peripheral blood samples using a BioRobot® EZ1 Workstation (Qiagen, Jesi, Italy). Exons and intron-exon boundaries of *UNC13D* (ID: 201294), were amplified and directly sequenced in both directions with the BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primers are available upon request. Sequences were analyzed and compared with the reported gene structure. The missense variations identified in patients were also assessed in parents.

Allele expression was evaluated in total RNA extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from heterozygous donors. RNA was reverse transcribed into cDNA with the ThermoScript™ RT PCR System (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and the exons containing the *UND13D* variations were amplified. PCR products were subcloned into the pGEMT vector (Promega Corporation, Madison, WI, USA) and transformed into TOP10 E.Coli competent cells

(Invitrogen). In each patient, 30 independent colonies were selected; plasmid DNA was extracted with QIAprep Spin miniprep Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) and sequenced.

Functional analysis of the variations

Munc13-4 cDNA (ImaGenes, BioDiscovery, Inc. Suite CA, USA) was subcloned into the pcDNA 3.1 expression vector (Invitrogen) and the Sv5 tag was added at the 5' end by PCR. The mutants were created in the Munc13-4 *wild-type* construct by PCR and then transfected into HMC-1 (gently provided by C. Dianzani) cells by Amaxa Cell Line Nucleofactor Kit V (Lonza, Basel, Switzerland), according to the manufacturer's instructions. Briefly, 4 µg of each construct were co-transfected with 1 µg of the pEGFP vector. Transfection efficiency was analysed by cytofluorimetric evaluation of the % of GFP expressing cells. To investigate Munc13-4 expression levels, cells were lysed and proteins resolved by gel electrophoresis were analysed using monoclonal antibodies raised to Sv5 and actin (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA). Immunoreactive proteins were visualized with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Canada).

To investigate primary granule exocytosis, transfected HMC-1 cells (1×10^6 /ml) were incubated in Tyrod Buffer (Hepes 10mM pH=7.4, NaCl 173mM, KCl 2.9mM, NaHCO₃ 12mM with 1.6mM CaCl₂ and 5mM Glucose) and stimulated with 10^{-6} M formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine peptide (fMLP, Sigma-Aldrich) at 37°C for 10 min. Exocytosis was then assessed on the GFP expressing cells, by cytofluorimetric analysis of CD63 expression using the mean fluorescence intensity between stimulated and unstimulated cells set at 100% [21].

The functional effect of the *FAS* mutations was assessed by transfecting the mutated cDNA in 293T cells. Wild type cDNA of *FAS* bearing the FLAG tag at the 5'-end was a kind gift of Giovina Ruberti (National Research Council, CNR, Rome). The p.Gln273His and mutants were created in the *FAS* construct by PCR. Cells were transfected and lysed as for Munc13-4 and immunoblotted with anti-FLAG mAb (Sigma-Aldrich). Fas function was evaluated by assaying caspase-8 activity as previously reported [22].

Functional analyses of patient NK cells

PBMC were cultured overnight at 37° C in 5% CO₂ in medium with or without Interleukin-2 (600 UI/ml) (Proleukin, Chiron Corp., Emeryville, USA) to test degranulation of resting and activated NK cells, respectively. PBMC derived from patients' relatives and/or unrelated healthy donors were tested in parallel. Surface expression of CD107a was assessed on CD3⁻CD56⁺ cells upon co-incubation of PBMC with K562 cells in the presence of Phycoerythrin-conjugated anti-CD107a

mAb for 2 hours at 37° C, as previously described [23,24]. Thereafter, cells were stained with APC-conjugated anti-CD56 and PerCP-conjugated anti-CD3 mAb and analysed by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson Biosciences, California, USA). Results were considered as $\Delta\%CD107a$ (i.e. % CD107a⁺ cells in stimulated samples - % CD107a⁺ cells in unstimulated samples). All reagents were from BD Biosciences. NK cells were also purified using the RosetteSep method (StemCell Technologies, Vancouver, British Columbia, Canada) following manufacturer's instructions and cultured in appropriate conditions to obtain high numbers of polyclonal activated NK cells [23]. To analyze the cytolytic activity in 4 hours ⁵¹Cr-release assays, PBMC were tested against K562 cells, while activated NK cells were tested against the HLA-class I-negative B-EBV cell line 721.221, as previously described; lytic units (LU) were calculated at 30% lysis [23,24].

Statistical analysis

Results from studies on protein function were compared by the Student's T test for paired samples. Genotype distributions were analysed with the Fisher's exact test. All P values are 2-tailed and the significance cut-off was $p < 0.05$.

Results

Genetic analyses

The coding sequences (exons and intron boundaries) of *UNC13D* were sequenced in 21 patients with ALPS (ALPS-FAS: N=7; ALPS-U: N=14) and 20 with DALD. We identified 6 heterozygous missense variations in *UNC13D* in 8 patients (2 ALPS-FAS, 3 ALPS-U, 3 DALD). The variations and their inheritance are described in Table 1 and Figure 1.

Two variations had been previously described in patients with FHL; two patients carried p.Ala59Thr (c.175G>A; rs9904366) and three p.Arg928Cys (c.2782C>T; rs35037984). Four other variations were identified, i.e. p.Cys112Ser (c.335G>C; rs141540493), p.Val781Ile (c.2342G>A; rs149871493), p.Ile848Leu (c.2542A>C; rs144968313), and p.Ala995Pro (c.2983G>C; rs138760432). These variations have been recently described in the dbSNP database as rare variants with an allele frequency <0.01 and each variant was found in a single patient. Pt. 4 carried two variations, p.Ile848Leu and p.Ala995Pro inherited from the same parent.

To assess the variation frequency in the general populations and in subjects with a different autoimmune disease, we sequenced *UNC13D* in 61 healthy controls and 38 patients with MS. Results showed that p.Ala59Thr was found in 5 healthy controls and 3 MS patients, and p.Arg928Cys in 8 healthy controls and 2 MS patients. Moreover, one healthy control carried the novel variation p.Pro271Ser (c.811C>T) absent in the other groups (Table 2). Since p.Ala59Thr and p.Arg928Cys were detected in all patient and control groups with similar allelic frequencies, they were not further considered. Since p.Cys112Ser, p.Val781Ile, p.Ile848Leu, and p.Ala995Pro were detected in the ALPS group only, we further assessed their frequency in the Italian population by genotyping them in 100 additional healthy controls. None of these variations were identified in these healthy controls indicating their allele frequency is relatively low.

Of the five patients whose inheritance pattern of *UNC13D* variations could be determined, four (80%) were maternal and one (20%) was paternal (Table 1). To evaluate whether this apparent bias was due to genetic imprinting favoring expression of the maternal allele, we performed RT-PCR on mRNA derived from Pt.2, and Pt.7, and two other patients who were heterozygous for the common synonymous polymorphism c.3198A>G (p.Gln1066Gln). Complementary DNA was then cloned and 30 independent clones were sequenced for each patient. Results showed that both alleles were expressed at approximately the same levels in each subject, which did not support maternal genetic imprinting in these patients (data not shown).

Functional analyses

Fas-induced cell death assessed in T cells from the ALPS and DALD patients carrying the *UNC13D* variations is shown in Figure 2A. All patients displayed defective Fas function except for Pt.1 whose Fas function was considered of borderline significance.

The *FAS* mutations present in Pt.1 and Pt.2 were p.Gln273His and p.Gln261Lys missense mutations respectively. To assess their effect on Fas function, the wild-type (Fas^{WT}) and mutated (Fas^{Gln273His}, Fas^{Gln261Lys}) forms of Fas cDNA were transfected into 293T cells. Twenty four hours after transfection, 293T cells were harvested and caspase-8 activity was assessed in cell lysates. Results showed that caspase-8 activation was significantly lower in the cells transfected with Fas^{Gln273Lys} and Fas^{Gln261Lys} than in those transfected with Fas^{WT} (Fig 2B).

The effects of the *UNC13D* missense variations on Munc13-4 protein expression and NK function were evaluated in all patient PBMC. NK function was evaluated by assessing the cytotoxic activity of resting NK cells against K562 cells, and that of activated NK cells against the HLA-class I-negative B-EBV cell line 721.221. Resting and activated NK cells were also tested for granule exocytosis, the most appropriate assay to detect Munc13-4 defects [25]. Results showed that values were in the normal range for all patients (data not shown), which was consistent with previous data on donors carrying heterozygous mutations of *UNC13D*.

To further assess the functional effect of the *UNC13D* variations detected in one subject only, they were inserted into a cDNA encoding *UNC13D* fused to the SV5 epitope tag. The Munc13-4^{WT}, Munc13-4^{Cys112Ser}, Munc13-4^{Val781Ile}, Munc13-4^{Ile848Leu}, Munc13-4^{Ala995Pro}, Munc13-4^{Ile848Leu/Ala995Pro}, and Munc13-4^{Pro271Ser} constructs were transfected into the HMC-1 mastocytoma cell line. Western blot analysis showed that all constructs were expressed at similar levels indicating that the polymorphisms did not have a substantial effect on Munc13-4 expression (data not shown). To assess the effect of these variations on Munc13-4 function, we evaluated the capacity of fMLP to induce secretory granule fusion with the plasma membrane in HMC-1 cells. Fusion was monitored by an increase in CD63 expression on the cell surface. Figure 3 shows that fMLP increased surface expression of CD63 by similar amounts in the cells transfected with Munc13-4^{WT} or Munc13-4^{Pro271Ser} constructs. In contrast, fMLP increased CD63 expression to a significantly lower extent in cells transfected with the Munc13-4^{Cys112Ser}, Munc13-4^{Val781Ile}, Munc13-4^{Ile848Leu}, Munc13-4^{Ala995Pro}, and Munc13-4^{Ile848Leu/Ala995Pro} constructs (*p<0.05). In untransfected cells fMLP-stimulated CD63 expression was lower than transfected cells (data not shown).

Discussion

Munc13-4 is a member of the Munc13-like family of proteins. It is involved in vesicle exocytosis, and is highly expressed in CTL, NK cells, and mast cells. It is characterized by two C2 domains separated by long sequences containing two Munc13-homology domains (MHD) [26,27,28,29]. C2 domains bind calcium ions and are involved in targeting proteins to cell membranes; MHD domains are essential for the cellular localization of Munc13-4. Once granules have tethered to the plasma membrane, a priming step is required to enable fusion of the granule membrane with the plasma membrane. In this priming step, cytotoxic granules interact with a docking complex composed of Munc18-2 and syntaxin-11. Munc13-4 then triggers switch of syntaxin-11 from a closed to an open conformation enabling fusion [29].

The present study detected six missense variations of *UNC13D* in ALPS-FAS (2/7, 29%), ALPS-U (3/14, 21%), and DALD (3/20, 15%) patients. Among them, two (p.Ala59Thr, p.Arg928Cys) had been previously reported in FHL3, whereas the other four (p.Cys112Ser, p.Val781Ile, p.Ile848Leu, p.Ala995Pro) were reported in the dbSNP database as rare variations with unknown functional and pathological significance. Moreover, both Ile848Leu and Ala995Pro have been described in one patient with systemic Juvenile Idiopathic Arthritis (SJIA) [30]

Only p.Ala59Thr and p.Arg928Cys were found in more than one patient, with the former carried by an ALPS-U and a DALD patient, and the latter by an ALPS-FAS and two DALD patients. These p.Ala59Thr and p.Arg928Cys variations were detected in several healthy controls and MS patients with similar allelic frequencies (p.Ala59Thr: ALPS 2.4%, DALD 2.5%, healthy controls 4.1%, MS 4%; p.Arg928Cys: ALPS 2.4%, DALD 5%, healthy controls 6.5%, MS 2.6%). These data argue against substantial role for these variations in ALPS and DALD. The p.Ala59Thr variation had been previously reported in two families with FHL, but always in *cis* with a pathogenic mutation making it difficult to assess its contribution to pathogenesis [31]. The p.Arg928Cys variation had been previously reported in FHL patients and a recent genotype-phenotype study detected it in 8 patients carrying biallelic *UNC13D* mutations from 7 unrelated families [24]; yet, some of these FHL3 patients had a third missense mutation too. Perhaps, it could be a mild variant whose effect could not be detected by the small groups of subjects used in our study.

The other four variations were carried by three ALPS patients and were absent in DALD and MS patients, and in the healthy controls, who showed one further variation (p.Pro271Ser), absent in the other groups. The p.Cys112Ser variation was located in the C2A domain involved in Munc13-4 function. This variation was detected in an ALPS-FAS patient who also carried the p.Pro261Lys *FAS* mutation. The *FAS* and the *UNC13D* mutations were inherited from the father and the mother, respectively, and both mutations decreased the function of the relative protein. The p.Ile848Leu and

p.Ala995Pro variations were carried by an ALPS-U patient and were in *cis* since both of them were inherited from the mother. Their functional analysis showed that both of them decreased Munc13-4 function. The p.Val781Ile variation located in the MHD2 domain was shown to influence Munc13-4 function. This variation was detected in a single ALPS-U patient. Finally, the p.Pro271Ser variation detected in the healthy control was located in the C2A domain but functional analysis showed that it did not decrease Munc13-4 function; this lack of functional effect was confirmed by *in silico* analysis with the SIFT 4.0.3 software (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>) (data not shown).

These data showed that rare loss of function variations of *UNC13D* are observed in ALPS patients with a higher frequency (7%) than in the healthy control (0%), DALD (0%), and MS (0%) groups. Thus, these variations may have an impact in the development of ALPS. Support for this hypothesis comes from a patient who carried loss-of-function mutations in *FAS*, *UNC13D*, and *XIAP*. He was not included in this study because the genetic and clinical complexity of his picture fulfilled the diagnostic criteria of ALPS but also shared features of FHL and X-linked lymphoproliferative disease (Chiocchetti et al, submitted).

Defective function of Fas and Munc13-4 might cooperate in disrupting the ability of the immune system to shut off and interfere with the anti-viral response. These processes involve both Fas and NK/NKT cell function whose cytotoxicity is crucial for the clearance of virus-infected cells and fratricide of activated immune cells [32]. Persistence of viral infection and an inability to switch off the immune response may contribute to the lymphocyte accumulation and the autoimmune reactions displayed by ALPS patients.

These data suggest that the *UNC13D* variations may be considered part of an oligogenic background predisposing to ALPS development. This may involve genes encoding for perforin (*PRF1*), osteopontin (*OPN*), and Signaling Lymphocyte Activation Molecule-Associated Protein (*SH2D1A*), whose variations have been suggested to be risk factors for ALPS or DALD development. From this point of view, it is noteworthy that patients 1, 3, 4, 5, 6, 7, and 8 also carried the c.1239A>C variation of *OPN*, associated with ALPS and DALD [33]. Further, patients 2 and 8 displayed hemizyosity for the -349T variation of *SH2D1A*, which has been associated with ALPS and DALD [34]. Finally, patient 7 also carried the p.Ala91Val variation of *PRF1*, which has been associated with DALD [16].

ALPS and DALD display a similar clinical picture and share an inherited defect of Fas function and the modifying effect exerted by variants of *OPN*, *PRF1*, and *SH2D1A*. However, DN T cell expansion is only present in ALPS, which may mark immunopathologic differences since a direct role has been ascribed to these cells in ALPS development. This work shows that mutations of

UNC13D may also represent an immunologic difference since they were detected in ALPS but not in DALD patients. Moreover, the *UND13D* variations were not detected in MS patients, which suggested that they are not a common risk factor for autoimmunity. However, a possible role of *UNC13D* in development of autoimmune diseases other than ALPS has been previously suggested by a report describing a child with SJIA who carried compound heterozygous mutations of *UNC13D* [35]. Moreover, decreased NK function has been detected in patients with systemic juvenile rheumatoid arthritis [36]. By contrast, the *OPN* and *PRF1* variants were involved in development of several other autoimmune diseases [37,38,39,40,41,42,43,44]. Future whole genome or exome sequencing studies will reveal the complex genetic scenario that may contribute to ALPS and DALD.

Author Contributions:

V.C., E.O., I.D., S.B., M.F.S., and G.C. performed the genetic analyses; E.B, M.M., S.M, and N.C. performed the functional experiments; S.P., C.C. and U.R characterized the patients; D.P., and A.C. analyzed the results; M.A., S. R. E., C.D., U.R. and U.D. designed the research and wrote the paper.

Acknowledgments:

The authors are grateful to C.Dianzani for providing HMC-1 cells.

Competing Interests:

The authors have declared that no competing interests exist.

References

1. Krammer PH (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789-95.
2. Dianzani U, Chiochetti A, Ramenghi U (2003) Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity. *Life Sci* 72: 2803-2824.
3. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, et al. (1995) Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81: 935-946.
4. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, et al. (1995) Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268: 1347-1349.
5. Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, et al. (1996) Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* 98: 1107-1113.
6. Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, et al. (1999) Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 98: 47-58.
7. Lenardo MJ, Oliveira JB, Zheng L, Rao VK (2010) ALPS - Ten Lessons from an International Workshop on a Genetic Disease of Apoptosis. *Immunity* 32: 291-295.
8. Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U, Fleisher TA, Jaffe ES, et al. (2010) Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood* 116 :e35-40.
9. Dianzani U, Bragardo M, DiFranco D, Alliaudi C, Scagni P, et al. (1997) Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 89: 2871-2879.
10. Ramenghi U, Bonisconi S, Migliaretti G, DeFranco S, Bottarel F, et al. (2000) Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. *Blood* 95: 3176-3182.
11. Campagnoli MF, Garbarini L, Quarello P, Garelli E, Carando A, et al. (2006) The broad spectrum of autoimmune lymphoproliferative disease: molecular bases, clinical features and long-term follow-up in 31 patients. *Haematologica* 91: 538-541.
12. Nagata S, Suda T (1995) Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* 16: 39-43.
13. Jackson CE, Fischer RE, Hsu AP, Anderson SM, Choi Y, et al. (1999) Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance. *Am J Hum Genet* 64 :1002-1014.

14. Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, Dale JK, Elkon KB, et al. (2001) The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 98: 194-200.
15. Clementi R, Dagna L, Dianzani U, Dupré L, Dianzani I, et al. (2004) Inherited perforin and Fas mutations in a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome and lymphoma. *N Engl J Med* 351: 1419-1424.
16. Clementi R, Chiocchetti A, Cappellano G, Cerutti E, Ferretti M, et al. (2006) Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function. *Blood* 108: 3079-3084.
17. Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA (2010) Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev* 235: 35-54.
18. Aricò M, Danesino C, Pende D, Moretta L (2001) Pathogenesis of haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol* 114 :761-769.
19. Fadeel B, Orrenius S, Henter JI (2001) Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: too little cell death can seriously damage your health. *Leuk Lymphoma* 42: 13-20.
20. Cetica V, Pende D, Griffiths GM, Aricò M (2010) Molecular basis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Haematologica* 95: 538-541.
21. Pivot-Pajot C, Varoquaux F, Saint Basile G, Bourgoin SG (2008) Munc13-4 regulates granule secretion in human neutrophils. *J Immunol* 180: 6786-6797.
22. De Franco S, Chiocchetti A, Ferretti M, Castelli L, Cadario F, et al. (2007) Defective function of the Fas apoptotic pathway in type 1 diabetes mellitus correlates with age at onset. *Int J Immunopathol Pharmacol* 20: 567-576.
23. Marcenaro S, Gallo F, Martini S, Santoro A, Griffiths GM, et al. (2006) Analysis of natural killer-cell function in familial Hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL): defective CD107a surface expression heralds Munc13-4 defect and discriminates between genetic subtypes of the disease. *Blood* 108: 2316-2323.
24. Sieni E, Cetica V, Santoro A, Beutel K, Mastrodicasa E, et al. (2011) Genotype-phenotype study of familial haemophagocytic lymphohistiocytosis type 3. *J Med Genet* 48: 343-352.
25. Bryceson YT, Pende D, Maul-Pavicic A, Gilmour KC, Ufheil H, et al. (2012) A prospective evaluation of degranulation assays in the rapid diagnosis of familial hemophagocytic syndromes. *Blood* 119:2754-2763.
26. Mènager MM, Mènasche G, Romao M, Knapnougel P, Ho CH, et al. (2007) Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nature Immunology* 8: 257-267.

27. Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, Certain S, Bacq D, et al. (2003) Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 1154: 461-473.
28. Rudd E, Bryceson YT, Zheng C, Edner J, Wood SM, et al. (2008) Spectrum, and clinical and functional implications of UNC13D mutations in familial haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet* 45: 134-141.
29. de Saint Basile G, Ménasché G, Fischer A (2010) Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat Rev Immunol* 10: 568-579.
30. Zhang K, Biroshak J, Glass DN, Thompson SD, Finkel T, et al. (2008) Macrophage activation syndrome in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis is associated with MUNC13-4 polymorphisms. *Arthritis Rheum.* 58: 2892-2896.
31. Santoro A, Cannella S, Bossi G, Gallo F, Trizzino A, et al. (2006) Novel Munc13-4 mutations in children and young adult patients with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet* 43: 953-960.
32. Lünemann A, Lünemann JD, Münz C (2009) Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity. *Mol Med* 15: 352-358.
33. Chiochetti A, Indelicato M, Bensi T, Mesturini R, Giordano M, et al. (2004) High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 103: 1376-1382.
34. Boggio E, Melensi M, Bocca S, Chiochetti A, Comi C, et al. (2012) The -346T polymorphism of the SH2D1A gene is a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation in males with defective Fas function. *Hum Immunol* 73: 585-592.
35. Hazen MM, Woodward AL, Hofmann I, Degar BA, Grom A, et al. (2008) Mutations of the hemophagocytic lymphohistiocytosis-associated gene UNC13D in a patient with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 58: 567-570.
36. Villanueva J, Lee S, Giannini EH, Graham TB, Passo MH, et al. (2005) Natural killer cell dysfunction is a distinguishing feature of systemic onset juvenile rheumatoid arthritis and macrophage activation syndrome. *Arthritis Res Ther* 7: R30-37.
37. Orilieri E, Cappellano G, Clementi R, Cometa A, Ferretti M, et al. (2008) Variations of the perforin gene in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 57: 1078-1083.
38. Cappellano G, Orilieri E, Comi C, Chiochetti A, Bocca S, et al. (2008) Variations of the perforin gene in patients with multiple sclerosis. *Genes Immun* 9: 438-444.
39. Solomou EE, Gibellini F, Stewart B, Malide D, Berg M, et al. (2007) Perforin gene mutations in patients with acquired aplastic anemia. *Blood* 109: 5234-5237.

40. Vastert SJ, van Wijk R, D'Urbano LE, de Vooght KM, de Jager W, et al. (2010) Mutations in the perforin gene can be linked to macrophage activation syndrome in patients with systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 49: 441-449.
41. Chiocchetti A, Comi C, Indelicato M, Castelli L, Mesturini R, et al. (2005) Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *J Neuroimmunol* 163: 172-178.
42. Chiocchetti A, Orilieri E, Cappellano G, Barizzone N, D' Alfonso S, et al. (2010) The osteopontin gene +1239A/C single nucleotide polymorphism is associated with type 1 diabetes mellitus in the Italian population. *Int J Immunopathol Pharmacol* 23: 263-269.
43. Barizzone N, Marchini M, Capiello F, Chiocchetti A, Orilieri E, et al. Association of osteopontin regulatory polymorphisms with systemic sclerosis. *Hum Immunol* 72: 930-934.
44. Comi C, Cappellano G, Chiocchetti A, Orilieri E, Buttini S, et al. (2012) The Impact of Osteopontin Gene Variations on Multiple Sclerosis Development and Progression. *Clin Dev Immunol* 212893.

Figure Legends

Figure 1. *UNC13D* and *FAS* variations carried by ALPS/DALD patients. Graphical representation (not in scale) of the Munc13-4 [A] and Fas [B] proteins (upper schemes: numbers indicate the amino acid positions) and genes (lower scheme: boxes represent the exons; arrows indicate the mutations). C2: C2 domain; MHD: Munc13-homology domain. PLAD: preligand assembly domain; TM: transmembrane domain; DD: death domain.

Figure 2. Defective Fas function in ALPS/DALD patients carrying *UNC13D* variations. [A] Fas-induced cell death in patients' T cells. Dotted line: upper limit of normal range. [B] Fas expression and function in lysates of 293T cells transfected with the wild-type (WT) or mutated form of *FAS* (Pt.1: p.Gln273His, Pt.2:) detected by western blot analysis (upper panel) and caspase-8 activity (lower panel), respectively.

Figure 3. Functional effect of the *UNC13D* variations. HMC-1 cells were transiently transfected with *UNC13D* WT and mutated forms, and CD63 expression was evaluated upon fMLP treatment. [A] Representative cytofluorimetric histograms of CD63 expression in fMLP-treated (black) or untreated (white) cells. [B] Means and standard errors from six experiments; asterisks mark the statistically significant differences versus cells transfected with the WT form.

Table 1. Gene variations detected in patients with ALPS or DALD.

Patient (gender)	Diagnosis	Fas function*			FAS	UNDI3D		
		Pt	F	M	Variation	Inh [†]	Variation	Inh [†]
Pt.1 (female)	ALPS-FAS	D	D	N	p.Gln273His (c.819G>C)	F	p.Arg928Cys (c.2782C>T)	M or F [‡]
Pt.2 (male)	ALPS-FAS	D	ND	ND	p.Gln261Lys (c.755G>A)	F	p.Cys112Ser (c.335C>G)	M
Pt.3 (female)	ALPS-U	D	D	D	-	-	p.Ala59Thr (c.175G>A)	M
Pt.4 (male)	ALPS-U	D	D	D	-	-	p.Ile848Leu (c.2542A>C)	M M
Pt.5 (female)	ALPS-U	D	ND	ND	-	-	p.Val781Ile (c.2342G>A)	ND
Pt.6 (male)	DALD	D	D	D	-	-	p.Ala59Thr (c.175G>A)	F
Pt.7 (female)	DALD	D	D	D	-	-	p.Arg928Cys (c.2782C>T)	M
Pt.8 (male)	DALD	D	D	ND	-	-	p.Arg928Cys (c.2782C>T)	ND

*: D=defective, N=normal, Pt=patient, F=father, M=mother

†: Inheritance, F=father, M=mother; ND= not determined; no parent displayed ALPS, DALD, XLP, or FHL; Pt.1's mother had rheumatoid arthritis.

‡: both parents carried the variation

Table 2. Missense variations detected in 21 ALPS, 20 DALD, 38 MS patients, and 61 healthy controls.

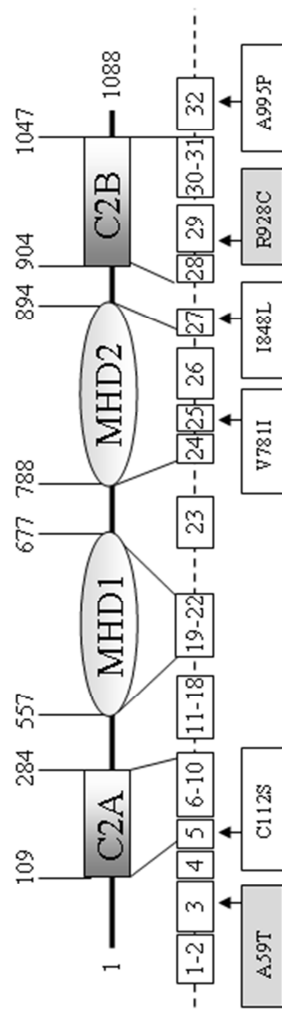
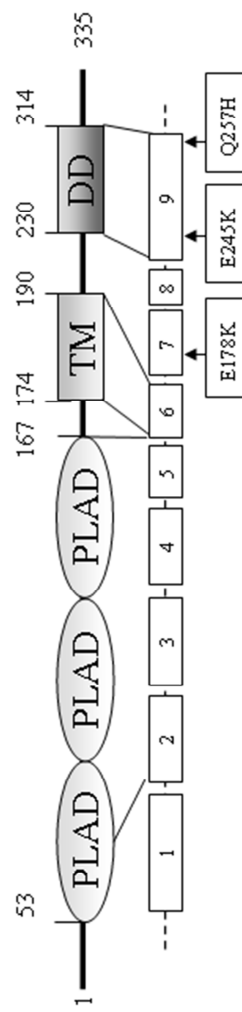
	Functional effect[‡]	ALPS (N=42)*	DALD (N=40)*	Controls (N=122)*	MS (N=76)*
Frequent variations[†]					
Arg928Cys	Not done	1	2	8	2
Ala59Thr	Not done	1	1	5	3
<i>Total alleles with frequent variations</i>		2	3	13	5
Private Variations[†]					
Ile848Leu[‡]	Loss-of-function [‡]	1	0	0	0
Ala995Pro[‡]	Loss-of-function [‡]	1	0	0	0
Cys112Ser	Loss-of-function	1	0	0	0
Val781Ile	Loss-of-function	1	0	0	0
Pro271Ser	Normal function	0	0	1	0
<i>Total alleles with loss of function private variations</i>		3	0	0	0
		<i>[p=0.03][§]</i>			

*: allele numbers

†: amino acid substitution

‡: carried in the same allele

§: P value vs Controls (Fisher exact test)

A**B****Figure 1**

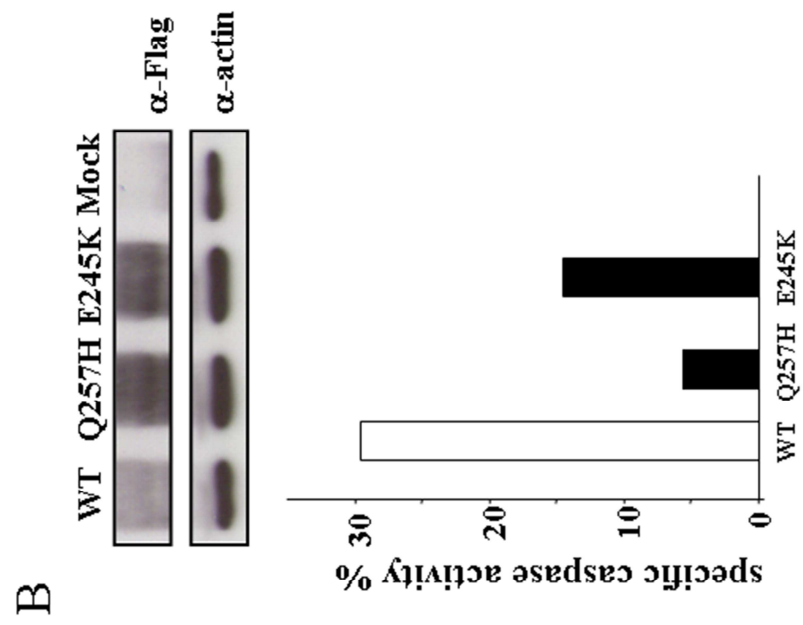
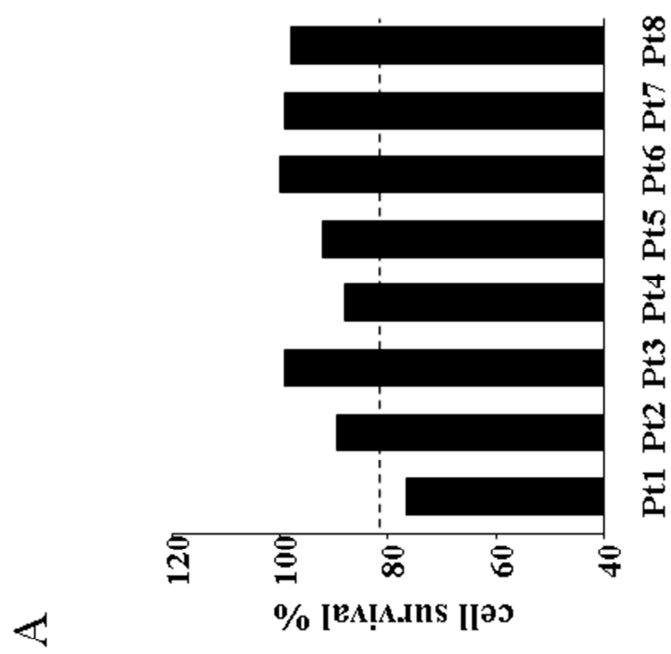


Figure 2

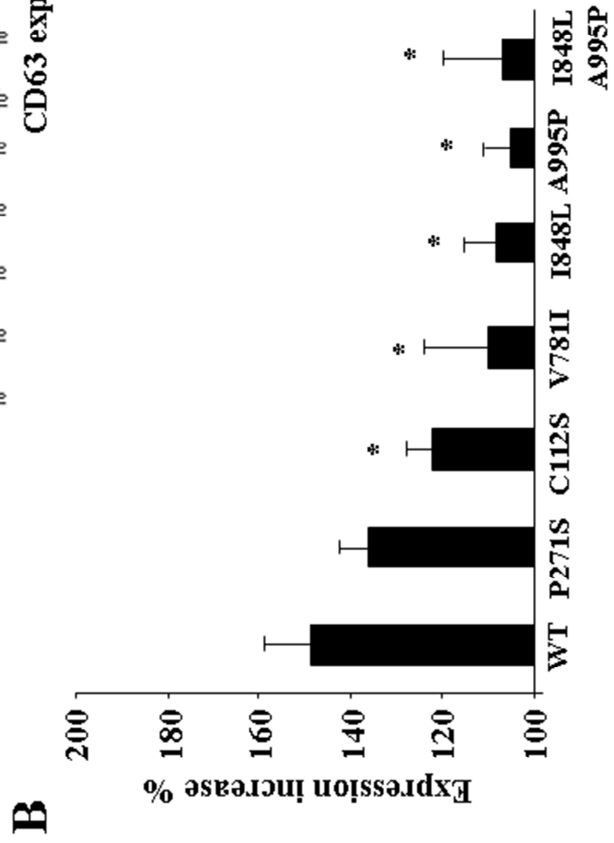
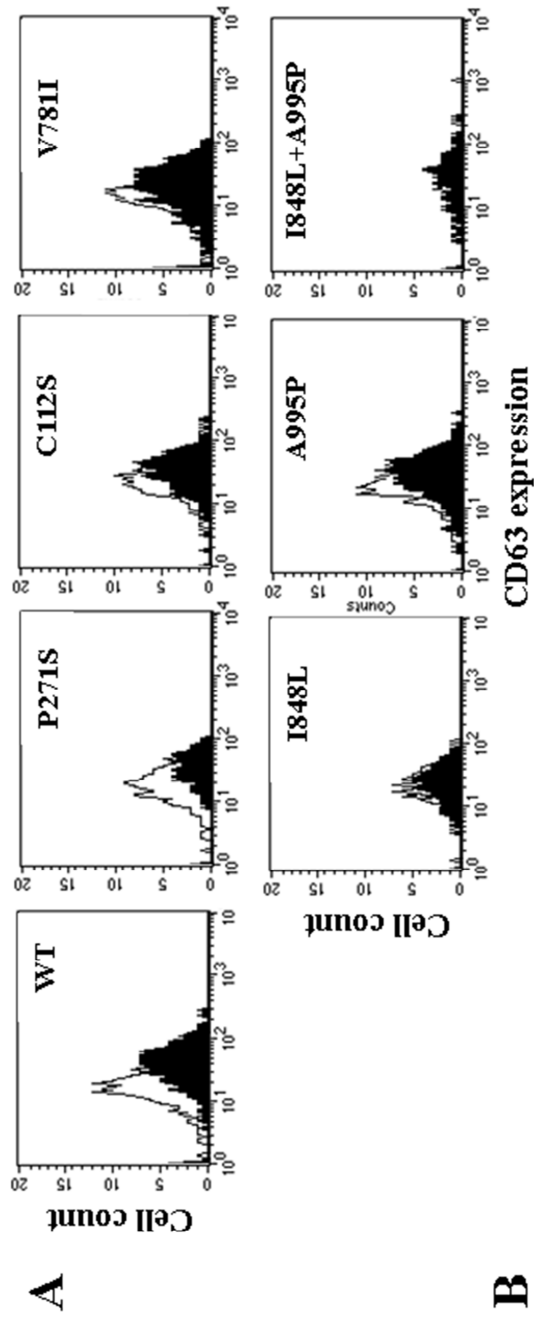


Figure 3

