



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : Scienza Mediche, Cliniche e
Sperimentali**

INDIRIZZO: Reumatologia Clinica e Sperimentale

CICLO XX°

**ESPRESSIONE DI MEMBRANA DELLA SERPINA SCCA E
DEREGOLAZIONE DEI LINFOCITI B: STUDIO IN PAZIENTI CON
INFEZIONE VIRALE ED IN PAZIENTI CON LUPUS ERITEMATOSO
SISTEMICO**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Silvano Todesco

Supervisore : Ch.mo Prof. Andrea Doria

Dottoranda: Laura Vidalino

“...Non vive ei forse anche sotterra, quando
gli sarà muta l'armonia del giorno,
se può destarla con soavi cure
nella mente de' suoi? Celeste è questa
corrispondenza d'amorosi sensi,
celeste dote è negli umani; e spesso
per lei si vive con l'amico estinto
e l'estinto con noi, se pia la terra
che lo raccolse infante e lo nutriva,
nel suo grembo materno ultimo asilo
porgendo, sacre le reliquie renda
dall'insultar de' nemi e dal profano
piede del vulgo, e serbi un sasso il nome,
e di fiori odorata arbore amica le ceneri di molli ombre consoli.
Sol chi non lascia eredità d'affetti poca gioia ha dell'urna...”
(Ugo Foscolo)

“La grandezza dell'uomo si misura in base a quel che cerca
e all'insistenza con cui egli resta alla ricerca.”
(Martin Heidegger)

“I nostri sogni e desideri cambiano il mondo.”
(Karl Popper)

Al mio papà, ora più di prima...

Alla mia mamma, per avermi indicato la strada quando mi ero persa...

Premessa

L'attività di ricerca oggetto di questa tesi di Dottorato è stata svolta presso il *Laboratorio di Epatologia Molecolare e di Reumatologia del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università degli Studi di Padova*, sotto la supervisione della Prof.ssa Patrizia Pontisso e del Prof. Andrea Doria.

Abstract

The hepatitis C virus (HCV) is one of the most successfully persistent hepatotropic viruses. HCV persists in up to 70% of acutely infected individuals, likely undermining virus-specific immunity, but leaving host defenses to other agents intact. HCV carriers may progress to a broad spectrum of liver diseases, as a consequence of complex interactions between viral and host factors, including the profile of the host immune response. Many studies suggest that cellular immune response plays a crucial role in the immunopathogenesis of HCV related chronic liver disease, but the mechanisms through which HCV generates an impairment of the immune system are largely unknown. Hepatitis C virus (HCV) leads frequently to chronicity of the infection and the role of B cells is largely unknown. The role of B cells in HCV infection is largely unknown.

Systemic Lupus erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease characterized by a number of organ manifestations and by the production of a broad variety of autoantibodies. Beside other immunologic disturbances, such as abnormalities of the complement system, T-B cell interaction, B cell hyperactivity represents a central feature of SLE. Therefore, characterization of the abnormalities of B cell biology is essential to gain further insights into the pathogenesis of this disease. SCCA, an overexpression, found in majority of primary liver cancers, is detectable in lymphocytes. To date, the potential involvement of the Squamous Cell Carcinoma Antigen (SCCA) in the pathogenesis of SLE and in HCV have not yet been investigated.

Aim of this study was to characterize SCCA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in HCV infected and in SLE patients.

45 HCV patients (14 chronic hepatitis, 17 cirrhosis, 14 hepatocellular carcinoma), 12 with SLE and 24 healthy controls were analyzed. Surface and cytoplasmic expression of SCCA in PBMC was assessed by FACS analysis. To define SCCA co-expression in B lymphocytes, different activation molecules (CD27, CD69, CD71, CD86 and CXCR3) were simultaneously evaluated. In purified B cells, SCCA RNA was quantified by Real Time PCR and localization of SCCA was defined by confocal microscopy and FACS analysis after trypsin treatment.

FACS analysis and confocal microscopy showed that SCCA was expressed on the surface of B lymphocytes in 68% of normal subjects and in 32% of HCV patients ($P < 0.03$), independently of disease stage and in SLE patients SCCA resulted not expressed in any of the patients ($P = 0.0000$). The higher frequency of SCCA expression on the surface of B lymphocytes of healthy subjects was associated with higher levels of serpin expression, compared to SCCA reactivity in HCV infected patients. Real Time PCR confirmed higher levels of transcription of the serpin in purified B cells of control subjects. SCCA positivity was significantly associated with CD27 reactivity.

HCV infection is associated with a marked reduction of SCCA being associated with the memory B cells molecule CD27 on B lymphocytes surface, suggesting a possible involvement of SCCA in B cell defects in HCV and in SLE. In SLE patients the serpin is not expressed on the surface of B lymphocytes. These findings suggest a

possible involvement of SCCA in the deregulation of B cell reactivity, during HCV infection and SLE.

RIASSUNTO

L'infezione HCV frequentemente cronicizza e l'evoluzione del quadro dipende da complesse interazioni tra il virus ed il sistema immunitario dell'ospite. Benché siano state descritte molteplici alterazioni dei linfociti B in corso di infezione cronica da HCV, il ruolo dei linfociti B nella mancata eliminazione del virus è ancora largamente sconosciuta. Dati recenti indicano che la serpina Squamous Cell Carcinoma Antigen (SCCA), associata con la proliferazione cellulare, è individuabile nei linfociti. Il Lupus Eritematoso Sistemico (LES) è una malattia infiammatoria cronica multifattoriale che coinvolge diversi organi. È caratterizzato da una patogenesi autoimmune, da diverse manifestazioni d'organo e dalla produzione di auto-anticorpi. Diversi studi documentano alterazioni nell'omeostasi dei linfociti B nel LES, come l'espressione aberrante di recettori o l'attivazione di vie di traduzione del segnale che controllano la proliferazione e il differenziamento delle cellule B, la produzione di anticorpi e l'apoptosi, suggerendo un ruolo chiave dei linfociti B nell'immunopatogenesi del LES.

Lo scopo del presente studio è stato la caratterizzazione dell'espressione di SCCA nelle cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) in pazienti affetti da virus dell'epatite C e da LES.

Sono stati analizzati 45 pazienti con infezione da HCV, compresi: 14 pazienti con infezione cronica, 17 pazienti con cirrosi epatica e 14 pazienti con carcinoma epatocellulare, 12 pazienti con Lupus Eritematoso Sistemico (LES). 24 soggetti sani sono stati utilizzati come controlli. L'espressione di superficie e intracitoplasmatica di

SCCA nei PBMC è stata analizzata mediante FACS. Nei linfociti B purificati, l'espressione di SCCA a livello trascrizionale è stata quantificata mediante Real Time PCR. La localizzazione cellulare della serpina è stata definita mediante analisi in microscopia confocale ed è stata confermata mediante citofluorimetria a flusso dopo trattamento dei linfociti B purificati con tripsina. Allo scopo di definire la co-espressione della serpina nei linfociti B, sono state contemporaneamente analizzate differenti molecole di attivazione (CD27, CD69, CD71, CD86 e CXCR3).

L'analisi citofluorimetrica e la microscopia confocale hanno documentato che SCCA è espressa sulla superficie dei linfociti B nel 68% dei soggetti sani e nel 32% dei pazienti ($P < 0.03$). L'entità di espressione della serpina è risultata ridotta nei pazienti HCV positivi rispetto ai controlli ($P = 0.0348$). Nei pazienti affetti da LES, SCCA non è risultata espressa in nessuno dei soggetti analizzati ($P = 0.0000$). La localizzazione della serpina sulla superficie dei linfociti B è stata ulteriormente confermata, mediante FACS, dopo trattamento delle cellule B con tripsina. La quantificazione di SCCA-RNA mediante Real Time PCR ha confermato la minore espressione della serpina nei linfociti B purificati dei pazienti HCV positivi rispetto ai controlli. La positività di SCCA è risultata significativamente correlata con l'espressione della molecola CD27, tipicamente associata alle cellule B della memoria ($P = 0.0069$). L'entità di espressione di CD27 è risultata significativamente aumentata nei linfociti B esprimenti SCCA nei soggetti sani rispetto alle cellule B dei pazienti HCV positivi ($P = 0.0408$), mentre nelle cellule B non esprimenti SCCA non è stata riscontrata nessuna differenza tra i due gruppi. Inoltre, è stata documentata una correlazione diretta ($r = 0.98$) tra l'entità di espressione della serpina e la reattività per CD27. In accordo con questi risultati,

l'analisi dell'espressione di CD27 nei linfociti B nei pazienti HCV infetti ha mostrato una significativa diminuzione della frequenza di cellule B CD27+ rispetto ai controlli ($P = 0.0085$).

I risultati ottenuti documentano una diminuita espressione della serpina SCCA nei linfociti B di pazienti HCV positivi rispetto ai soggetti sani. In questi pazienti la ridotta espressione è associata ad una riduzione dei linfociti B della memoria attivati. Questi dati suggeriscono un possibile ruolo di SCCA nel deficit del processo di maturazione dei linfociti B durante l'infezione da HCV, con potenziali riflessi sulla scarsa efficienza del sistema immune nella eliminazione virale. Nei pazienti affetti da LES la serpina non è risultata essere espressa a livello di superficie dei linfociti B, fornendo nuove ipotesi circa i difetti di funzione dei linfociti B nel LES. Questi dati suggeriscono un possibile coinvolgimento della serpina SCCA nella deregolazione della reattività delle cellule B, tipicamente riscontrata nell'infezione da virus dell'epatite C e nei pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico.

Introduzione

Il sistema immunitario: i linfociti B

1.1. Il sistema immunitario

La funzione principale del sistema immunitario è quella di proteggere l'organismo dell'ospite da agenti patogeni mediante un complesso sistema di controllo e di eliminazione dell'agente stesso. In linea generale, esistono due tipi di risposta: innata (o naturale) ed acquisita (o specifica). La prima è costituita dalle barriere chimico-fisiche (PH, pelle, mucose, saliva, lacrime ecc.), dai fagociti, dal sistema del complemento, mentre la seconda si distingue in umorale (mediata dai linfociti B) e cellulo-mediata (mediata dai linfociti T). La differenza principale tra i due tipi di immunità consiste nel fatto che la risposta di tipo acquisito è molto più specifica per l'agente che l'ha indotta, inoltre l'efficacia della risposta immunitaria aumenta ad ogni successivo incontro con lo stesso patogeno.

Le risposte immunitarie sono mediate in primo luogo dai leucociti che comprendono cellule fagocitiche (monociti, macrofagi e granulociti neutrofili) che si legano al patogeno, lo internalizzano e lo distruggono. Dato che i leucociti utilizzano

dei sistemi di riconoscimento primitivi e non specifici, queste modalità rientrano nella cosiddetta “immunità innata”¹.

Un altro gruppo di leucociti è rappresentato dai linfociti; essi rappresentano gli elementi centrali di tutte le risposte di tipo acquisito in quanto sono in grado di riconoscere specificamente il singolo patogeno. i linfociti sono distinti in tre popolazioni: linfociti T, linfociti B e cellule Natural Killer (NK) (Figura 1). Tutti i linfociti derivano da cellule staminali del midollo osseo, ma mentre i linfociti T maturano nel timo, i linfociti B maturano nel midollo osseo^{2,3} (Figura 2).

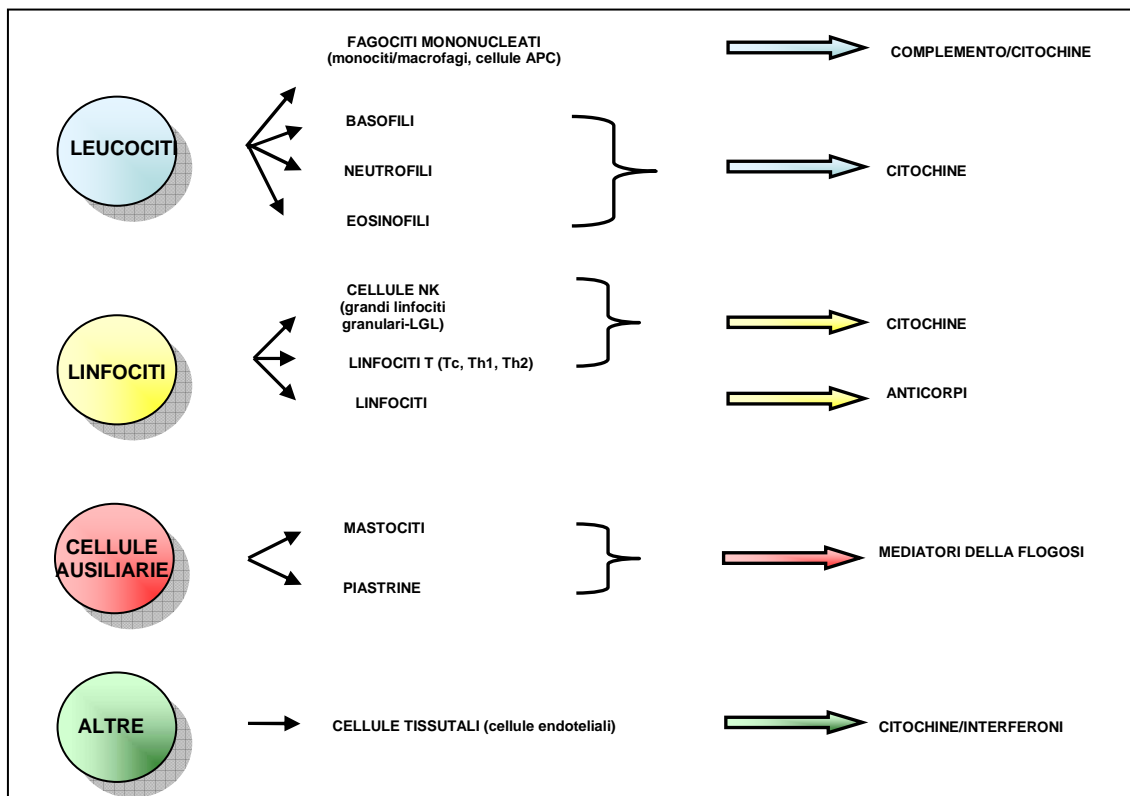


Figura 1. Cellule del sistema immunitario. Principali componenti del sistema immunitario, con indicazione delle cellule che producono i mediatori solubili.

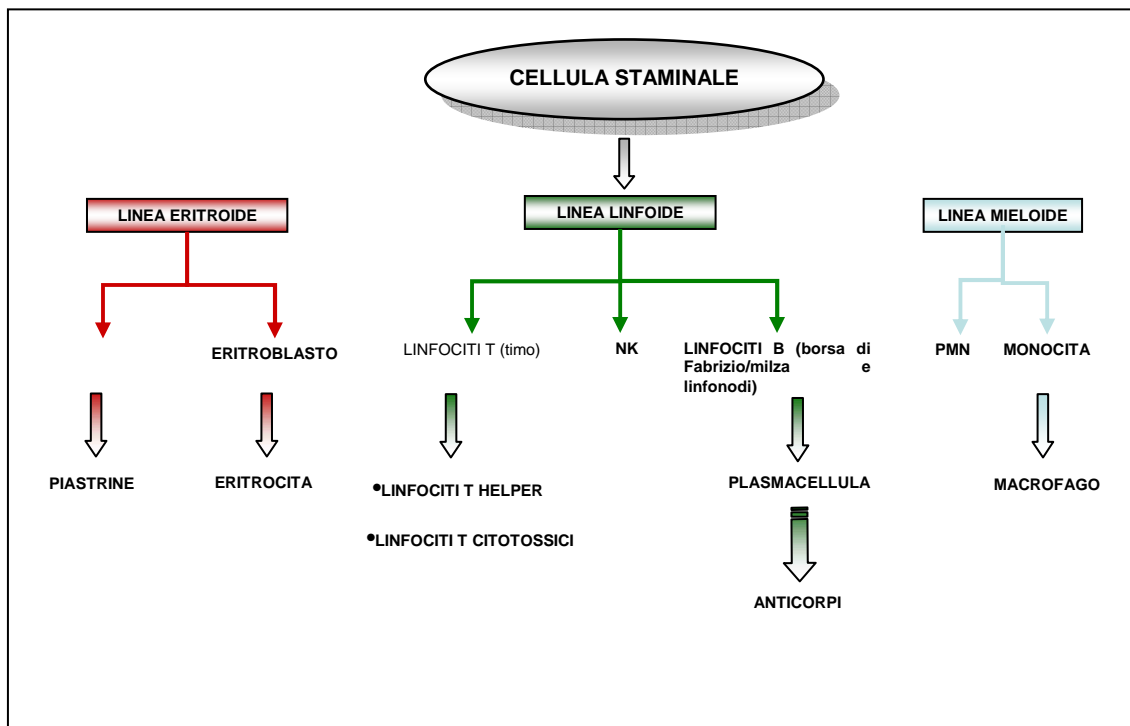


Figura 2. Origine delle cellule del sistema immunitario. Differenziamento dei principali componenti del sistema immunitario a partire da un'unica cellula staminale pluripotente: linea eritroide, linea linfoide e linea mieloide.

I linfociti T e B auto-reattivi vengono eliminati, nel timo e nel midollo osseo, attraverso una selezione negativa che definisce la cosiddetta “tolleranza centrale”. Tuttavia talvolta alcune di queste cellule auto-reattive sfuggono alla selezione ed i loro recettori sono in grado di riconoscere gli antigeni con una certa affinità⁴. Nonostante la presenza di cellule auto-reattive, in condizioni normali non si sviluppano eventi di autoimmunità (risposta immunitaria contro il *self*) grazie all'esistenza di un sistema di controllo chiamato “tolleranza periferica”. Esistono alcuni meccanismi responsabili di

questo processo come la mancata attivazione delle cellule dendritiche (DCs) che esprimono peptidi *self* ed i bassi livelli di molecole costimolatorie ⁵.

Ciascun linfocita B è in grado di riconoscere una specifica molecola antigenica mediante un recettore di superficie. Dopo il riconoscimento, la cellula B si divide e si differenzia in plasmacellula, la quale produce e secerne una grande quantità di molecole (anticorpi) che rappresentano la forma solubile del recettore che ha riconosciuto l'antigene ³.

I linfociti T si dividono in molte sottopopolazioni ciascuna delle quali possiede diverse funzioni. Una sottopopolazione interagisce con i linfociti B, facilitando la loro proliferazione, differenziazione e sintesi di anticorpi; l'altra interagisce con i fagociti mononucleati potenziandone le loro attività. Queste due sottopopolazioni sono note con il nome di linfociti T helper (Th) e linfociti T citotossici (Tc). I linfociti T riconoscono l'antigene solo in associazione a marcatori di membrana dell'ospite ed il riconoscimento avviene attraverso una molecola di superficie, il TCR (*T Cell Receptor*), correlabile per funzioni e per struttura al recettore di superficie per l'antigene dei linfociti B (BCR, *B Cell Receptor*). Le cellule B agiscono sia mediante la produzione di proteine solubili (le citochine) che fungono da segnale per altre cellule, sia mediante interazioni cellula-cellula^{2,3}.

Lo sviluppo dei linfociti T e B a partire da una cellula staminale pluripotente richiede un differenziamento che passa attraverso una serie di eventi che iniziano nel midollo osseo e terminano nel timo (linfociti T) o nei tessuti linfoidei periferici (linfociti B) (Marrak). Durante il differenziamento, i linfociti acquisiscono la capacità di

riconoscere gli antigeni “*self*” dai “*non self*” attraverso l’espressione di recettori antigene-specifici chiamati rispettivamente TCR e BCR ⁶.

Il TCR è costituito da una catena α e da una catena β unite da un ponte disolfuro, mentre il BCR è costituito da immunoglobuline di membrana. La formazione del TCR e del BCR è un processo complesso in cui un ruolo determinante è svolto dall’IL-7 e coinvolge numerosi enzimi. Il BCR riconosce polipeptidi ed oligopeptidi, incluse strutture secondarie e terziarie (antigeni conformazionali) e antigeni non peptidici ⁶. Al contrario, il TCR riconosce solo piccoli peptidi lineari di 10-12 aminoacidi che sono stati processati e presentati dalle cellule APC (*Antigen Presenting Cell*) in associazione alle molecole MHC ^{7,8}.

Nelle risposte di tipo acquisito, i linfociti sono i depositari dei meccanismi di riconoscimento dell’antigene che si verificano tramite la “selezione clonale”. Quando un antigene si lega alle poche cellule in grado di riconoscerlo, queste ultime proliferano rapidamente fino a sviluppare un numero sufficiente di cellule specifiche per poter eliminare l’antigene stesso. In altri termini, in un processo chiamato selezione clonale, l’antigene seleziona i cloni specifici per i propri determinanti antigenici ⁹.

Il sistema immunitario è caratterizzato da un’enorme plasticità e, dopo l’avvenuta eliminazione del patogeno, le cellule che sono intervenute nella risposta immunitaria ritornano alle condizioni iniziali, ristabilendo la cosiddetta “omeostasi immunitaria” ¹. L’attivazione dei linfociti T è programmata per essere autoregolata ed è associata ad una parallela stimolazione ed attivazione di recettori di tipo inibitorio. Tra questi figurano CD32, CD22 e gp49B1 caratterizzati dalla presenza di sequenze conservate a livello della porzione citosolica del recettore stesso ¹⁰.

Talvolta alcuni linfociti possono sopravvivere allo *shrinkage* della risposta immunitaria originando il *pool* di cellule della memoria che, in caso di un successivo contatto con il patogeno, attueranno una risposta immunitaria specifica, veloce e maggiormente efficace con conseguente rapida eliminazione del bersaglio.

In conclusione, l'efficacia del sistema immunitario dipende dall'interazione di diversi componenti, sia umorali che cellulari e che si sviluppano in diverse fasi della vita fetale e neonatale precoce. Le caratteristiche principali della risposta immunitaria sono la diversità e la specificità (la risposta è diretta unicamente verso il patogeno che causa l'infezione), la capacità di distinguere il “*self*” dal “*non self*” (è essenziale infatti che un sistema di protezione specifico sia in grado di distinguere sostanze o agenti estranei o “*non self*”) e la memoria. Il sistema immunitario si è sviluppato mediante un unico meccanismo di ricombinazione genetica che ha prodotto un repertorio di meccanismi e di effettori virtualmente illimitato a partire da un numero limitato di geni. Per la sua versatilità e capacità di adattamento, per la sua fine regolazione dei meccanismi di risposta, il sistema immunitario rimane imparagonabile a qualunque altro sistema biologico.

1.2. I linfociti B: aspetti generali, strutturali e funzionali

Le cellule B rappresentano il 5-15% del *pool* totale dei linfociti circolanti e classicamente esprimono immunoglobuline sulla loro superficie (queste immunoglobuline sono prodotte dallo stesso linfocita, al contrario di quelle legate alla superficie dei mastociti, prodotte sempre dal linfocita). Le molecole immunoglobuliniche agiscono come dei recettori specifici per l'antigene e, a differenza dei TCR, possono esistere sia in forma solubile (gli anticorpi) sia come recettore di superficie per l'antigene. La maggior parte delle cellule B circolanti esprime sulla sua superficie due isotipi di immunoglobulina dotati della stessa specificità: le IgD e le IgM; solo pochi linfociti circolanti esprimono IgG, IgA o IgE. Una differenza fondamentale tra i linfociti T e B è che mentre il TCR dei linfociti T riconosce solo piccoli peptidi processati e presentati dalle cellule APC in associazione alle molecole MHC di classe I o II, l'immunoglobulina può riconoscere strutture complesse tridimensionali dette "determinanti conformazionali"¹¹.

Come illustrato nella figura 3, i linfociti B umani e murini esprimono anche altre molecole in superficie quali gli antigeni MHC di classe II fondamentali nell'interazione tra linfocita T e cellula B. Le molecole di classe II sono rappresentate dagli antigeni I-di topo e dagli antigeni DP, DQ e DR nell'uomo. Sulla superficie dei linfociti B, sono identificabili anche il recettore per il frammento C3b del complemento (CR3) ed il recettore per il C3d (CR2). Sono inoltre espressi anche recettori per le IgG non prodotte da quel linfocita (FcγRII). Comunque, i più importanti marcatori di superficie utilizzati

per identificare i linfociti B sono il CD19, il CD20 ed il CD22. Altre molecole specifiche vanno dal 72 al 78 (il CD72 è stato anche identificato sui linfociti murini)⁷. L'attivazione dei linfociti B comporta una maggiore espressione di marcatori di superficie già presenti e l'espressione *de novo* di marcatori prima assenti (marcatori di attivazione).

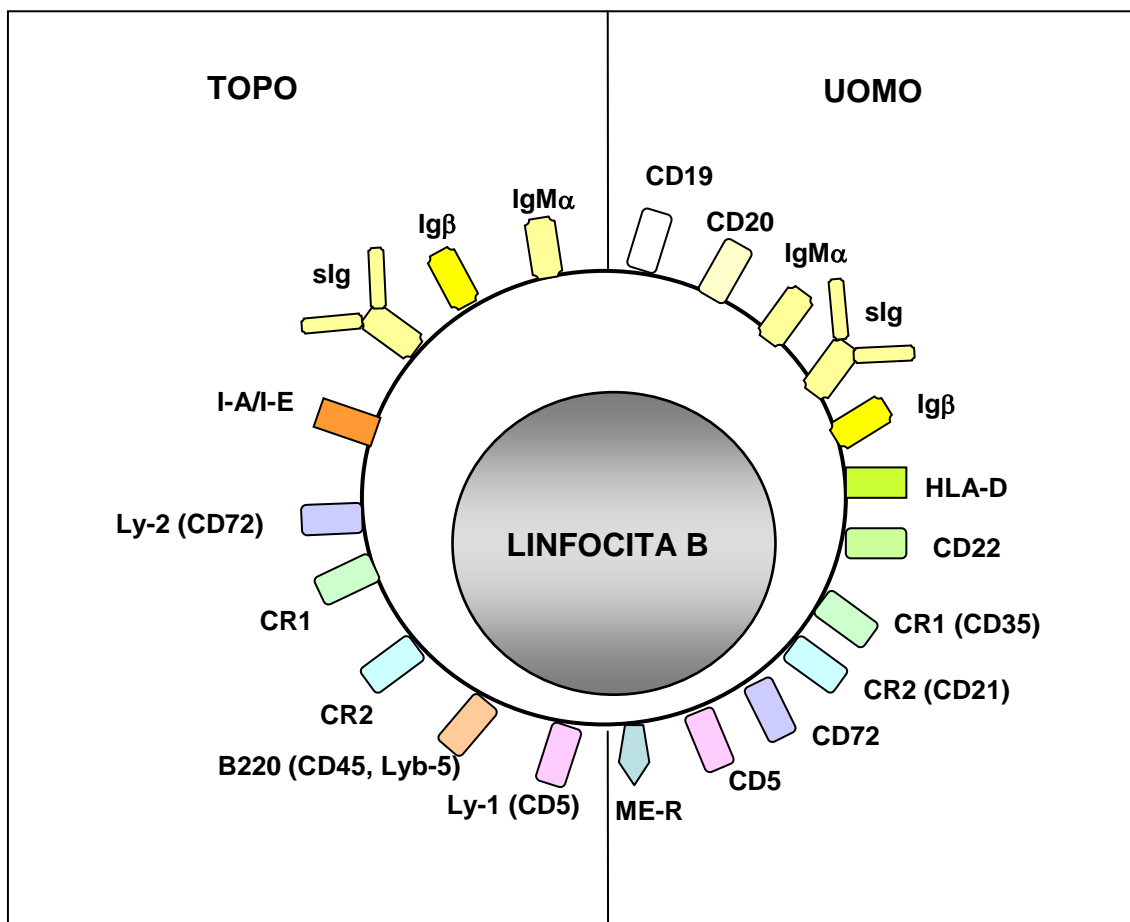


Figura 3. Marcatori di superficie dei linfociti B circolanti umani e murini. A sinistra vengono rappresentati schematicamente i marcatori di superficie del topo, a destra quelli dell'uomo. Molte di queste molecole sono omologhe. In questo caso sono rappresentate con lo stesso colore.

I linfociti B sono generati dal differenziamento di progenitori ematopoietici staminali e, allo stadio maturativo completo, sono in grado di generare una risposta immunitaria efficace contro i patogeni. Essi si sviluppano direttamente nelle aree emopoietiche del fegato fetale dove le cellule staminali linfoidi proliferano, si differenziano e vanno incontro al riarrangiamento genico per le immunoglobuline. In seguito queste cellule maturano a linfociti pre-B che diventano poi linfociti B immaturi ed infine linfociti B maturi che, dopo stimolazione antigenica, possono differenziarsi in cellule della memoria o in plasmacellule (cellule produttrici di anticorpi), (Figura 4).

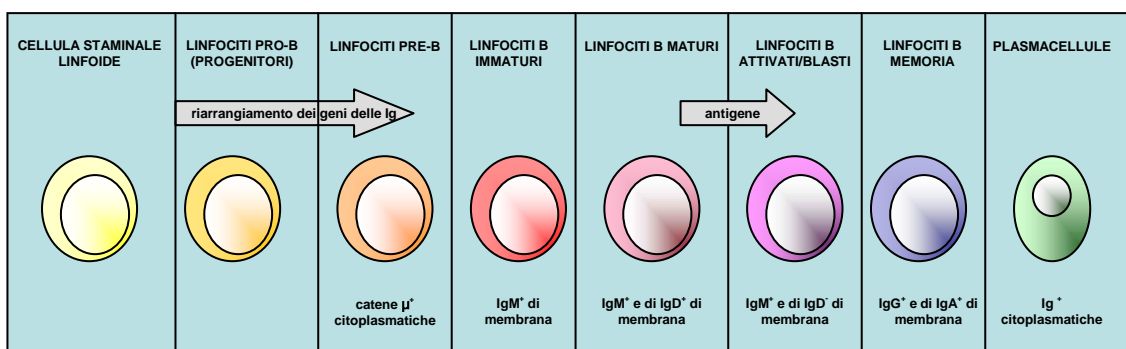


Figura 4. Differenziazione dei linfociti B. I linfociti B si differenziano dalle cellule staminali in linfociti B vergini che, dopo l'incontro con l'antigene, possono diventare plasmacellule o linfociti memoria, dopo una fase di proliferazione, attivazione ed trasformazione blastica.

Successivamente la sede della linfopoiesi B passa dal fegato al midollo osseo. La linfopoiesi B a livello del midollo osseo non si svolge in aree distinte, tuttavia è stato dimostrato che i progenitori dei linfociti B sono adiacenti all'endostio delle lamelle ossee¹². La maggior parte (oltre il 75%) dei linfociti B che matura nel midollo osseo non raggiunge il circolo generale, ma va incontro ad apoptosi e viene fagocitata dai macrofagi midollari. Durante le prime fasi della maturazione dei linfociti B sono necessari dei fattori di crescita e di differenziamento e i recettori per questi fattori sono espressi in vari stadi della maturazione delle cellule B.

Il modello strutturale degli anticorpi è quello proposto da Porter nel 1962 che prevede una struttura delle immunoglobuline a quattro catene: due catene pesanti (H, 50-77 kDa) e due catene leggere (L, 25 kDa). Vi sono due tipi di catene leggere (κ e λ) e cinque tipi di catene pesanti che corrispondono alle cinque classi di immunoglobuline (γ , α , μ , δ e ϵ). Le catene possiedono una regione costante (C) ed una regione variabile (V). Le due catene leggere hanno due ponti disolfuro, mentre a livello delle catene pesanti esistono quattro ponti disolfuro. Ciascuno di questi legami porta alla formazione di un anello polipeptidico che rappresenta la porzione centrale di una regione più ampia (110 residui) che viene chiamato "dominio"; il dominio più esterno, sia della catene leggere sia di quelle pesanti, corrisponde alla regione variabile delle due catene, rispettivamente V_L e V_H . I domini V delle catene pesanti e leggere si associano per formare il sito di legame per l'antigene e la specificità di ciascun sito di legame dipende dagli aminoacidi presenti nella catena. Quindi anticorpi con differente specificità possiedono sequenze aminoacidiche diverse nella regione V. La diversità anticorpale

trae origine da eventi di “ricombinazione genica” proprio a livello dei locus genici per le catene leggere e pesanti.

Il legame dell’antigene con il BCR innesca fondamentalmente quattro processi principali: proliferazione dei linfociti B (nei linfonodi), differenziamento in plasmacellule che producono anticorpi, formazione delle cellule della memoria e presentazione dell’antigene alle cellule T. Il BCR utilizza delle chinasi *Src-type* per dare inizio alla trasduzione del segnale e questo processo viene aumentato dall’intervento del complesso costimolatorio CD21-CD19-CD81. CD21 è il recettore della proteina C2d del complemento: C3d interagisce con CD21 e con l’antigene legato al BCR e determina un cambiamento nel CD19 aumentando il segnale intracellulare. Successivamente al legame dell’antigene con le immunoglobuline di superficie, la cellula B internalizza, processa ed esprime gli epitopi antigeni in MHC e li presenta alle cellule T. Le cellule T possono modulare le funzioni dei linfociti B in vari modi: le citochine IL-4, IL-5, IL-6, IL-2 e l’IFN- γ aumentano la proliferazione dei B ed il differenziamento in plasmacellule.

L’interazione tra le cellule T e le cellule B implica il legame della molecola CD40 con il suo ligando (CD40-L) che gioca un ruolo chiave nello *switching isotipico* delle immunoglobuline. Infatti, i linfociti B naïve esprimono sulla superficie le IgM e le IgD, mentre dopo la stimolazione si verifica uno *switch* per cui essi producono IgA, IgG o IgE^{1, 13}. Comunque, anche dopo lo *switch*, la specificità dell’anticorpo prodotto da un determinato clone rimane identica cioè un clone cellulare può produrre un solo tipo di sito di legame per l’antigene e questo può far parte di molecole anticorpali di classe differente. In pratica, un clone cellulare è programmato per produrre un solo tipo di

catena leggera ed un solo tipo di regione V per la catena pesante, ma può operare lo *switch* di quest'ultima su regioni C di catene pesanti appartenenti a classi diverse. Questo processo è caratterizzato da eventi di ricombinazione dei geni delle catene pesanti delle immunoglobuline. Gli anticorpi prodotti da una plasmacellula di un dato clone hanno tutti la stessa specificità ed appartengono tutti alla stessa classe immunoglobulinica.

La funzione principale dei linfociti B è quella di produrre gli anticorpi, ma nell'ambito della risposta immunitaria di tipo innato essi svolgono anche altre funzioni come l'espressione dei *Toll Like Receptors* (TLRs), infatti i linfociti B esprimono livelli elevati di TLR-9 e di TLR-10. L'espressione di quest'ultimi risulta aumentata dopo l'attivazione del BCR o con l'intervento della molecola CD40. Dal momento che TLR-9 riconosce le regioni CpG non metilate tipiche dei batteri con genoma a DNA ed è coinvolto nelle risposte iniziali ai microrganismi, le cellule B possono dunque svolgere delle funzioni tipiche della risposta immunitaria innata. L'espressione inducibile del TLR nelle cellule B può rappresentare un *link* tra le risposte immunitarie innate e quelle acquisite¹⁴. Le cellule B possono inoltre produrre delle citochine infiammatorie (es. IL-6, IL-10) che indirizzano la differenziazione dei linfociti T naïve in Th1 e Th2¹⁵, secernere dei fattori che possono direttamente mediare la distruzione del patogeno¹⁶. Infine, i linfociti B possono fungere anche da APC, in particolare le cellule B esprimono la molecola CD5 ed il fattore reumatoide^{17, 18, 19}.

Alle funzioni di tipo acquisito, si aggiungono delle funzioni che rientrano nel contesto della risposta immunitaria di tipo innato. Tra queste vi sono: regolazione delle

risposte T-dipendenti, ruolo nell'attivazione delle cellule dendritiche ²⁰, regolazione del differenziamento dei linfociti T, infine *up*-regolazione di molecole costimolatorie ¹⁶.

In conclusione, i linfociti B rappresentano uno dei tipi cellulari fondamentali nella risposta immunitaria dove svolgono diverse funzioni che abbracciano sia risposte di tipo acquisito sia di tipo innato, divenendo così un anello di congiunzione cruciale tra due tipi di risposta immunitaria.

Introduzione

Virus dell'epatite C (HCV), Lupus Eritematoso Sistemico (LES) e linfociti B

2.1. Il virus dell'epatite C (HCV)

2.1.1. Aspetti generali

Il virus dell'epatite C (HCV) è l'unico membro del genere *hepacivirus* appartenente alla famiglia dei *Flaviviridae*. L'HCV è caratterizzato dalla presenza di un envelope e possiede un genoma ad RNA a singolo filamento con polarità positiva. Il genoma è costituito da 9.600 nucleotidi con un singolo *open reading frame* (ORF) che codifica per una poliproteina precursore di 3.000 aminoacidi (Figura 4).

La poliproteina viene processata dalle proteasi virali e della cellula ospite nel reticolo endoplasmatico. I prodotti proteici comprendono: la proteina *core* (C) che costituisce la maggior parte del nucleocapside; le proteine glicosilate dell'*envelope* (E1 e E2); un oligopeptide (p7) che sembra essere una viroporina; proteine non strutturali coinvolte nell'azione proteolitica (NS2, NS3, NS4), nella formazione dei complessi di

replicazione (NS4B), nel legame con l'RNA (NS5A) ed una polimerasi RNA-dipendente (RdRp) ²¹.

Una delle caratteristiche dell'HCV particolarmente importante in relazione alla risposta immunitaria della cellula ospite è l'instabilità genomica che determina un'alta variabilità con un alto tasso di mutazione ($1.5-2 \times 10^6$ sostituzioni di base per sito genomico per anno) e la conseguente generazione di mutanti virali.

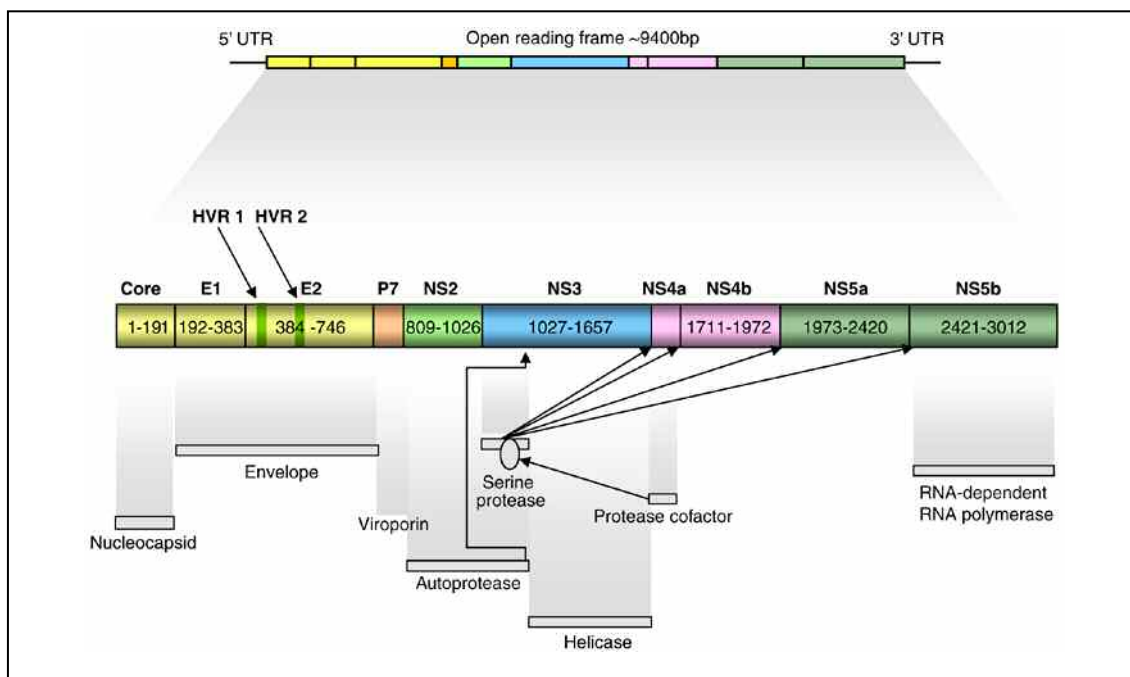


Figura 4. Il virus dell'epatite C (HCV): genoma, struttura polipeptidica e funzioni proteiche. Il genoma di HCV è costituito un ORF di circa 9.400 bp che viene tradotto in una singola poliproteina di 3.000 aa. Il polipeptide viene poi tagliato in 10 proteine mature, come indicato. Vengono mostrate anche le funzioni dei prodotti proteici conosciuti e la posizione della regioni ipervariabili 1 e 2. [Da Lloyd *et al.*, 2007. *Immun and Cell Biology* 85: 24-32].

Essendo un virus epatotropico, l'HCV replica nel fegato ²² (Figura 5). Il suo ciclo vitale è conosciuto solo in parte dal momento che non esiste ancora un sistema di colture cellulari efficace. Comunque, negli ultimi anni sono stati fatti numerosi progressi in tal senso mediante l'utilizzo di nuovi sistemi di espressione del virus. L'HCV replica primariamente negli epatociti, ma diversi studi hanno documentato la presenza di genoma virale e di antigeni in altri tipi cellulari quali le cellule di Kupffer e le cellule endoteliali. Inoltre, il virus è stato trovato anche nei leucociti periferici, nei linfonodi, nelle cellule epiteliali del cervello ²³. Questi rappresentano dei siti di replicazione extra epatica.

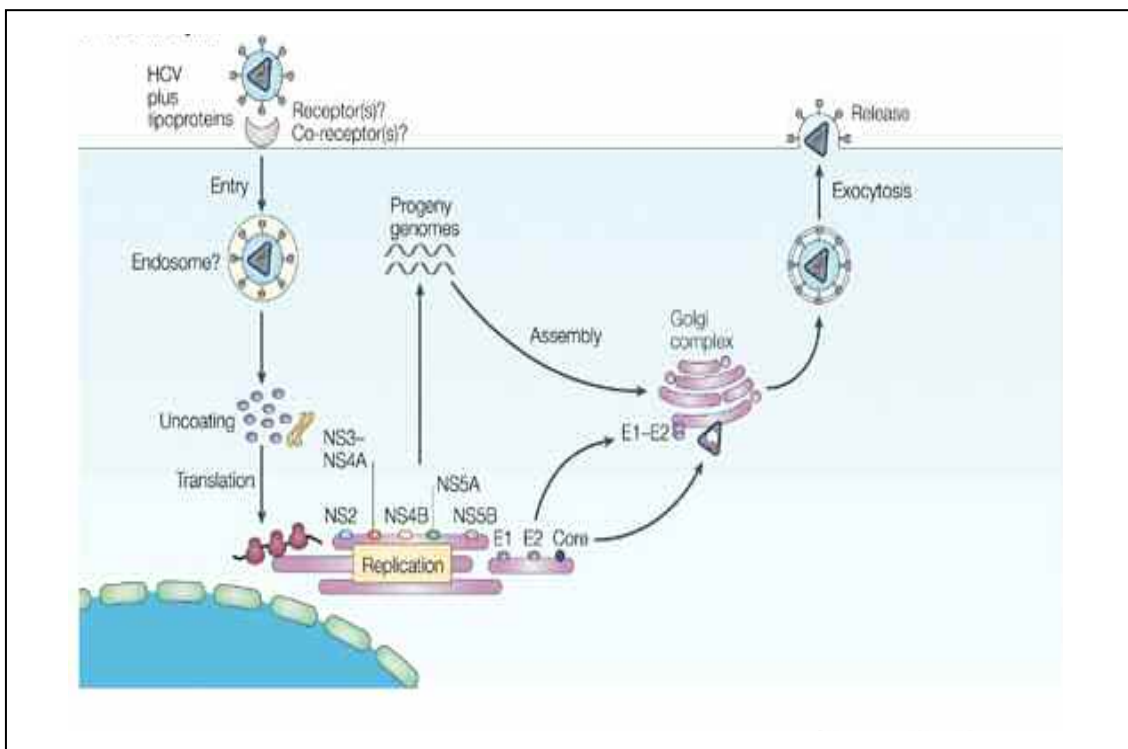


Figura 5. Ciclo vitale dell'HCV. E, envelope; NS, non structural protein; POL, polymerase; [Da Rehermann *et al.*, 2005. *Nat Rev Immunol.* 5: 215-229].

2.1.2. HCV e risposta immunitaria: i linfociti B

L' HCV è uno dei virus epatotropici con la maggiore capacità di persistenza e di cronicizzazione ²⁴. L' HCV persiste in oltre il 70%-80% degli individui infetti e l'infezione può evolvere in un ampio spettro di malattie epatiche che vanno dall'epatite cronica alla cirrosi epatica e all'epatocarcinoma. L'esito dell'infezione ed il grado della malattia sono il risultato di complesse interazioni tra il virus e la risposta immunitaria dell'ospite, incluso il profilo di risposta immunitaria dell'ospite ^{25, 26} (Figura 5). Molti studi suggeriscono un ruolo chiave della risposta immunitaria di tipo cellulare nel controllo dell'infezione da HCV e nell'immunopatogenesi della malattia epatica ^{27, 28, 29, 30, 31}, ma i meccanismi attraverso cui l'infezione HCV genera un *impairment* della risposta immunitaria (quindi la mancata eliminazione del virus da parte del sistema immunitari) e la progressione della malattia a non sono stati ancora del tutto chiariti.

Molti studi hanno dimostrato l'importanza della risposta immunitaria T-mediata nel controllo dell'infezione virale, ma il ruolo dei linfociti B nella risposta immunitaria in corso di infezione da virus C è ancora ampiamente sconosciuto. Tuttavia è stata documentata la presenza di anticorpi *envelope*-specifici nel siero di pazienti con epatite C cronica, indicando l'esistenza di una risposta immunitaria B-mediata ³².

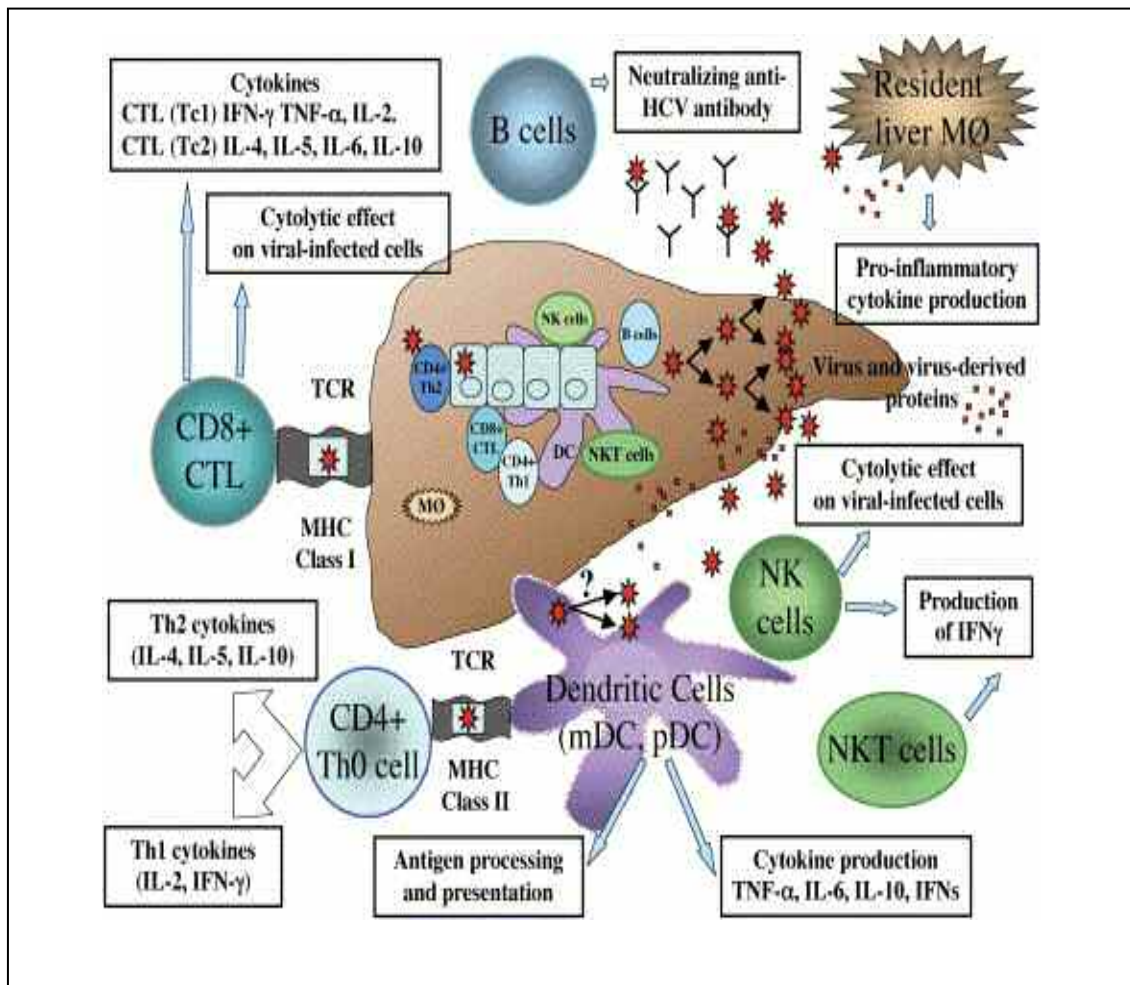


Figura 5. La risposta immunitaria innata e adattativa nell'epatite C. La risposta immunitaria innata coinvolge l'attivazione di macrofagi del fegato (MØ), cellule dendritiche, cellule NK e cellule NKT. La risposta immunitaria acquisita comprende tra gli effettori i linfociti T helper (CD4⁺), i linfociti T citotossici (CD8⁺) ed i linfociti B. CTL, cytotoxic T lymphocytes; HCV, hepatitis C virus; IFN,interferon; IL, interleukin; MHC, major histocompatibility complex; NK, natural killer; TNF, tumor necrosis factor. [Da Szabò *et al.*, 2006. *Clin Liver Dis*, 10: 753-751].

L'infezione cronica da HCV è spesso associata ad un ampio spettro di alterazioni a carico dei linfociti B. La produzione di anticorpi neutralizzanti verso il virus è ancora incerta, sebbene sembra verificarsi in talune circostanze. Talvolta, gli anticorpi neutralizzanti vengono prodotti a basse concentrazioni e questo potrebbe favorire la selezione di virus mutati che contribuiscono al diffondersi dell'infezione. Inoltre, le cellule B possono proliferare in modo aberrante e produrre il fattore reumatoide, come ad esempio durante le manifestazioni extraepatiche³³.

Le attuali conoscenze sulle possibili funzioni dei linfociti B nell'HCV ed il ruolo del virus nell'espansione clonale delle cellule B proposte da Mondelli³⁴ sono descritte nella figura 6.

Negli ultimi anni diversi studi hanno indagato la risposta immunitaria B-mediata anche in relazione all'evoluzione clinica dell'infezione. In particolare, in letteratura esistono diversi contributi circa il ruolo della regione ipervariabile 1 (HVR1) durante l'infezione da HCV. E' stato dimostrato che anticorpi, generati dopo immunizzazione, contro HVR1, specifici per i motivi altamente conservati, possono riconoscere l'RNA del virus presente nel plasma dei pazienti e di bloccare il legame di HCV alle cellule Molt-4 che normalmente sono in grado di legare il virus³⁵. Ad ogni modo il ruolo di HVR1 nell'interazione tra l'ospite ed il virus resta tuttora sconosciuto.

L'infezione da HCV è frequentemente associata a manifestazioni extra epatiche quali la crioglobulinemia mista di tipo II ed il linfoma non Hodgkin's B che sono caratterizzate dalla proliferazione dei linfociti B e dalla loro espansione clonale³⁶. L'espansione monoclonale non-neoplastica tipica delle crioglobulinemia e quella neoplastica del linfoma non Hodgkin's sono probabilmente dovute ad una stimolazione

antigenica prolungata³⁷. Il meccanismo attraverso cui l'infezione promuove una potente selezione clonale dei linfociti B è attualmente sconosciuto, esso probabilmente è un processo *multistep* caratterizzato dall'accumularsi di mutazioni genetiche similmente a quanto accade in alcuni linfomi associati all'infezione cronica da *Helicobacter pilori*³⁸. La capacità del virus di stimolare direttamente le cellule B tramite la tetraspanina CD81 che lega specificamente la glicoproteina E2 suggerisce che esso sia in grado di svolgere delle funzioni che vanno oltre la semplice persistenza dell'infezione. Infatti, la presenza di HCV replicante può risultare nell'espansione clonale di cellule B esprimenti regioni variabili delle immunoglobuline che comunemente sono espresse nei disordini linfoproliferativi associati al virus C. Perché avvenga questo è ancora oggetto di speculazione. Sebbene vi siano sufficienti evidenze in favore del ruolo dei prodotti genici virali nell'indurre l'espansione clonale dei linfociti B, restano ancora molti aspetti da delucidare circa la capacità del virus di infettare e di replicare in altri tipi cellulari diversi dagli epatociti.

In conclusione, l'HCV può sviluppare diverse strategie per eludere la *clearance* immunitaria e stabilire un'infezione persistente. L'elevata quantità di particelle virali prodotte durante la fase iniziale dell'infezione può causare la non efficiente risposta immunitaria di tipo innato^{39, 40}. La variabilità intrinseca dell'HCV, verosimilmente indotta dalla pressione immunologica selettiva dell'ospite su alcune porzioni del virus può portare alla selezione di mutanti resistenti alla risposta T-mediata^{41, 42}. Diverse evidenze suggeriscono che la proteina core può inibire la funzionalità dei linfociti T^{43, 44}. Comunque, attualmente il significato reale della risposta immunitaria B-mediata in corso di infezione da HCV è largamente sconosciuto.

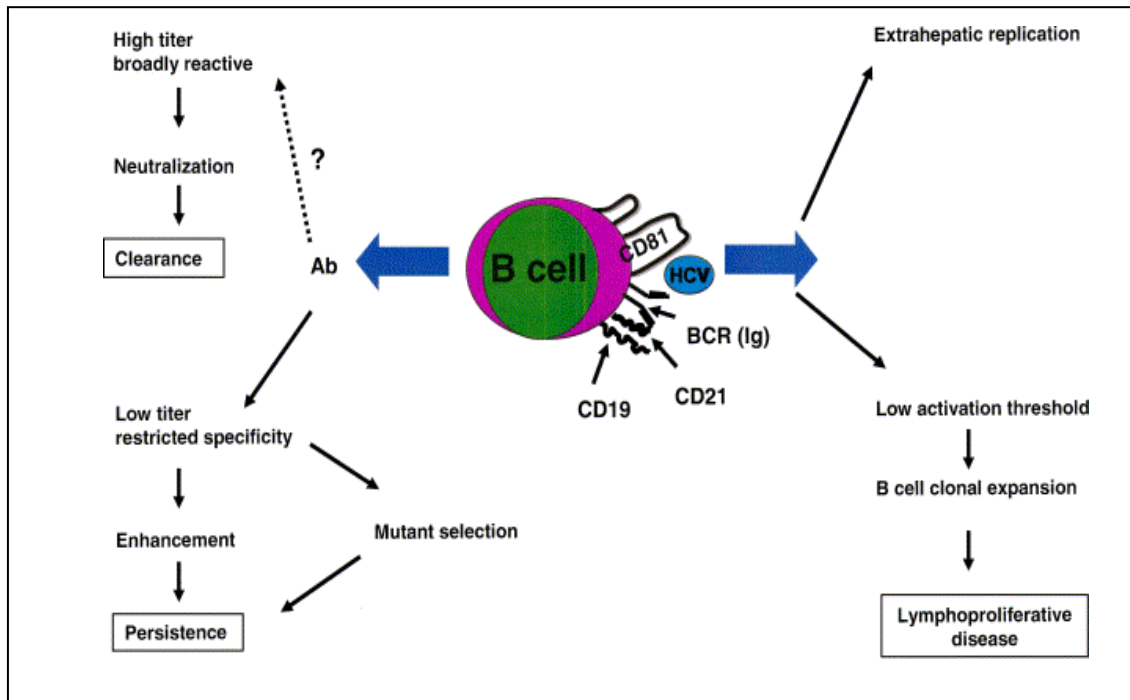


Figura 6. Funzioni dei linfociti B nell'infezione da HCV. (A) In alcune circostanze, può verificarsi la produzione di anticorpi neutralizzanti. Questi anticorpi dovrebbero essere prodotti ad alte concentrazioni e possibilmente avere un ampio spettro di specificità. Talvolta però, gli anticorpi neutralizzanti potrebbero essere prodotti a basse concentrazioni e con un specificità ristretta; questo favorirebbe da una parte la selezione dei mutanti virali e dall'altra potrebbe incrementare la suscettibilità ad infettarsi di altre cellule. (B) In aggiunta alla classica produzione di anticorpi, le cellule B possono proliferare in modo aberrante e produrre il fattore reumatoide, come in manifestazioni extraepatiche quale la crioglobulinemia. Polipeptidi di HCV (come le glicoproteine E2 e NS3) possono diminuire l'attivazione fisiologica dei linfociti B interagendo con la molecola CD81 e il complesso del BCR inducendo un'espansione clonale che può determinare una proliferazione maligna. [Da Mondelli 2003. *Antiv Res* 60: 111-115]

2.2. Lupus Eritematoso Sistemico (LES)

2.2.1. Caratteristiche generali

Il Lupus Eritematoso Sistemico (LES) è una malattia infiammatoria cronica multifattoriale caratterizzato da una patogenesi autoimmune, che coinvolge diversi organi ed apparati, tra i quali spiccano per gravità o prevalenza la cute, le articolazioni, il rene, il sistema polmonare, il pericardio, il sistema ematopoietico ed il sistema nervoso centrale ⁴⁵.

Nella patogenesi del LES sono coinvolti fattori genetici (associazione con HLA DR2 e DR3), ambientali (raggi Uv, farmaci, agenti chimici), virali (HTLV-1, HIV, HCV), endocrini (ormoni sessuali) ed immunologici.

I principali fattori immunologici coinvolti nel LES sono:

1. disregolazione a carico dei linfociti T: modificazioni numeriche e funzionali con espansione di cellule T autoreattive e perdita della tolleranza verso gli antigeni *self*;
2. disregolazione dei linfociti B: aumento della produzione spontanea di immunoglobuline, produzione di autoanticorpi;
3. formazione di immunocomplessi (costituiti principalmente da anticorpi legati ad a DNA) che si depositano a livello tissutale provocando delle reazioni infiammatorie che portano all'attivazione del sistema del Complemento e delle piastrine e conseguente richiamo di polimorfonucleati e di macrofagi;

-
4. produzione di autoanticorpi: anti citoplasma (anti-RNP), anti fattori sierici (anti-globulina), anti fosfolipidi (anti-cardiolipina, *lupus anticoagulant*), anti elementi cellulari (anti-eritrociti, anti-piastrine);
 5. alterazioni dell'apoptosi: aumento della morte cellulare programmata con rilascio di nucleosomi nello spazio extra cellulare e conseguente produzione di autoanticorpi;
 6. disregolazione delle citochine: aumento della produzione di IL-10 in seguito alla alterazione del promotore del gene per IL-10 che mappa sul cromosoma 1 nella regione 31q. Qui sono presenti anche i geni per alcuni componenti della via del Complemento, per Fas-L.

Nella figura 7 viene schematizzata la patogenesi del LES.

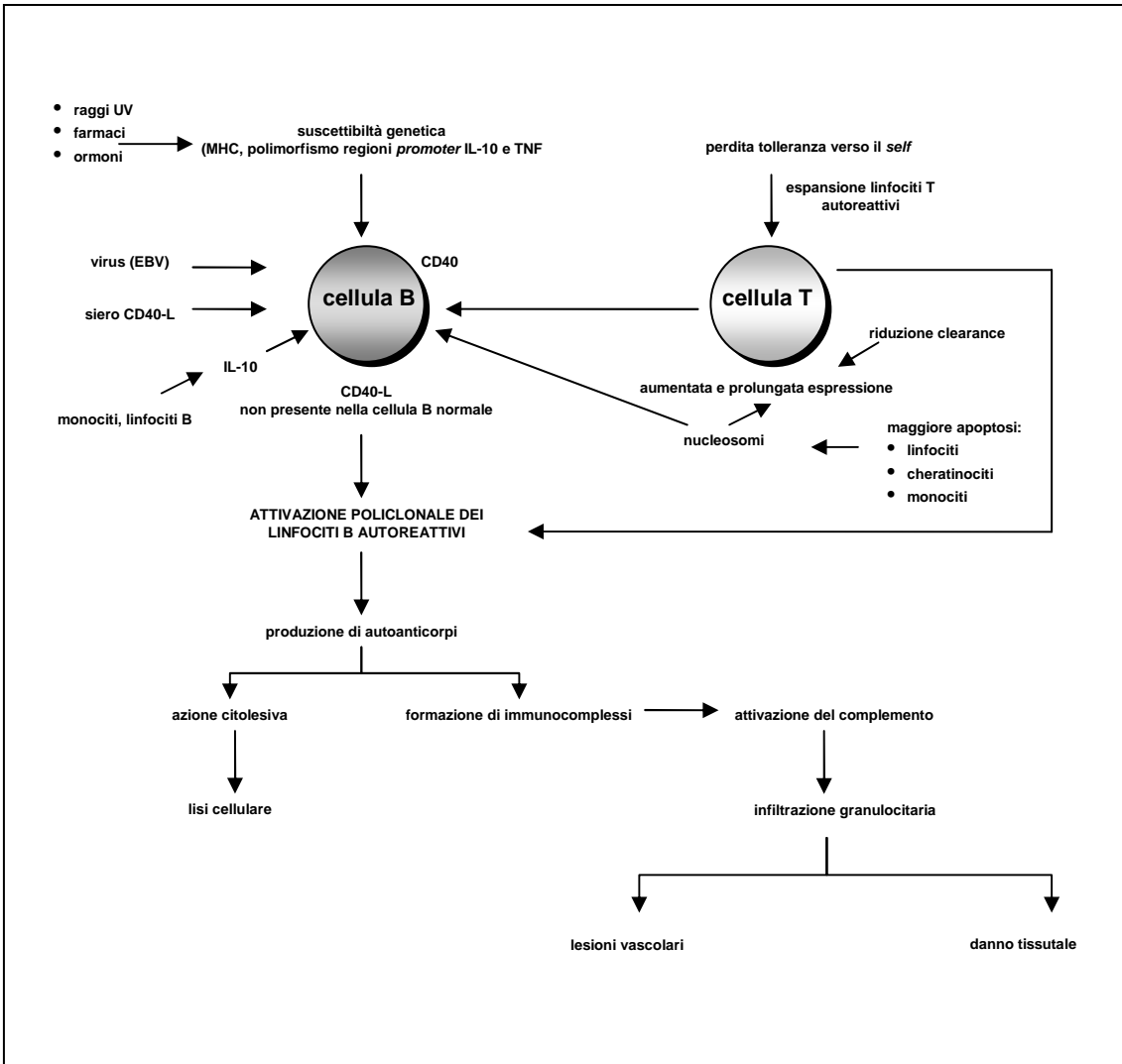


Figura 7. Patogenesi del LES. Schematizzazione del ruolo dei linfociti T e B nella patogenesi autoimmune.

2.2.2. LES e risposta immunitaria: i linfociti B

Il meccanismo alla base dell'immunopatogenesi sembra essere una iper-attività dei linfociti B autoreattivi dovuta ad attivazione policlonale, con conseguente produzione di auto-anticorpi reattivi verso diversi antigeni (anticorpi antinucleo, anti-DNA nativo o a doppia elica)⁴⁵. Questi auto-anticorpi sono diretti verso antigeni di superficie (es. eritrociti, leucociti) e verso antigeni circolanti con conseguente formazione di immunocomplessi circolanti. Non è noto il perché della produzione di autoanticorpi, ma i principali meccanismi responsabili sono fondamentalmente due.

Il primo meccanismo prevede che la risposta immune sia direttamente stimolata dagli autoantigeni e quindi sia T-dipendente. Questa ipotesi è sostenuta dal fatto che gli autoanticorpi nel LES originano da un riarrangiamento genico e da mutazioni somatiche tipiche nelle risposte indotte da antigeni.

Secondariamente, sembra che i linfociti B siano stimolati in modo aspecifico. Infatti, nel LES l'alterazione principale è una iper-attività dei linfociti B autoreattivi dovuta ad attivazione policlonale, con conseguente produzione di auto-anticorpi reattivi verso diversi antigeni^{45,46}. Questi auto-anticorpi sono diretti verso antigeni di superficie (es. eritrociti, leucociti) e verso antigeni circolanti con conseguente formazione di immunocomplessi circolanti (Figura 8). Non è ancora chiaro il perché di una così elevata produzione di auto-anticorpi; a questo proposito, sono state avanzate diverse ipotesi che comprendono la stimolazione aspecifica dei linfociti B (attivazione policlonale) forse da parte di Heat Shock Protein prodotte dalle cellule sotto stress o da parte di superantigeni che possono attivare in modo aspecifico i recettori dei

linfociti T e quindi stimolare secondariamente i linfociti B. Quest'ultima ipotesi è sostenuta dal fatto che gli auto-anticorpi nel LES derivano da un riarrangiamento genico e da mutazioni somatiche tipiche di una risposta indotta da antigeni^{46,47}.

In conclusione, l'iperattività dei linfociti B dovuta a diverse alterazioni nelle vie di trasduzione del segnale giocano un ruolo determinante nella patogenesi del LES. Comunque, i meccanismi alla base di ciò non sono stati ancora del tutto chiariti.

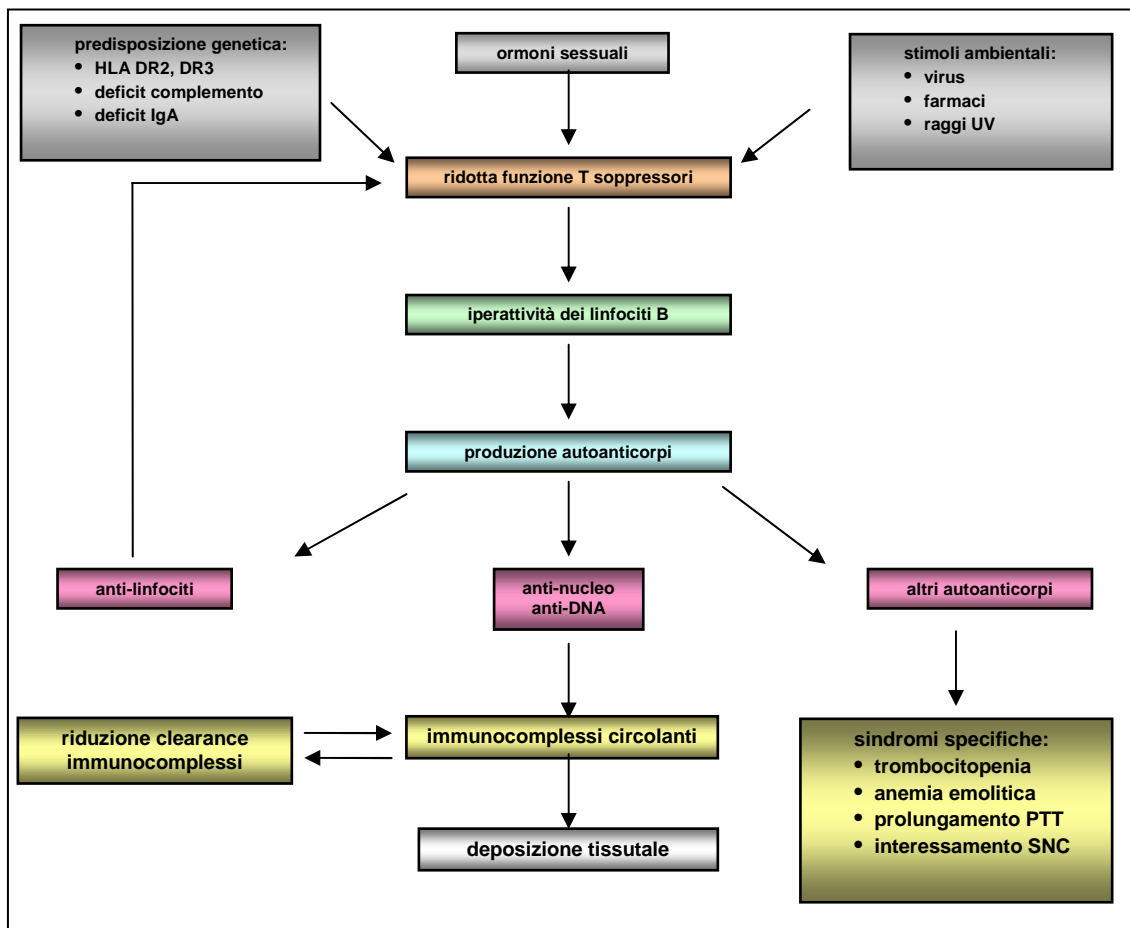


Figura 8. LES: eziopatogenesi. Principali agenti eziopatogenetici nel LES con riferimento al ruolo dei linfociti B.

Introduzione

Squamous Cell Carcinoma Antigen (SCCA)

3.1. Squamous Cell Carcinoma Antigen

3.1.1. Caratteristiche generali

Lo Squamous Cell Carcinoma Antigen (SCCA) è una proteina ad alto peso molecolare (45 KDa), caratterizzata da due isoforme (SCCA1 e SCCA2), appartenente alla superfamiglia delle serpine.

Le serpine (serine proteinase inhibitors) sono inibitori di proteasi seriniche che generalmente regolano diverse vie di traduzione del segnale come il riarrangiamento citoscheletrico, l'adesione cellulare, la morte cellulare programmata e la proliferazione cellulare^{48, 49}; recenti dati indicano che SCCA può indurre crescita tumorale attraverso l'inibizione dell'apoptosi e la deregolazione della proliferazione cellulare^{50, 51}. Le serpine sono quindi coinvolte in attività biologiche di notevole importanza per il mantenimento dell'omeostasi cellulare, svolgendo un'azione di regolazione a livello della cascata proteolitica che, com'è noto, rappresenta un momento fondamentale di numerosi processi cellulari⁵².

SCCA è iper-espressa in diversi tumori maligni di origine squamocellulare (cancro della cervice uterina, dell'esofago, del polmone, ecc.)^{53, 54} e in caso di tumori

benigni di origine epiteliale ⁵⁵; attualmente viene utilizzata come marcatore sierologico per il carcinoma della cervice uterina ⁵⁶. Diversi studi indicano che SCCA1 gioca un ruolo importante nella diminuzione dell'apoptosi *in vitro* e nell'aumento della crescita tumorale *in vivo* ⁵⁷.

SCCA è stata identificata come proteina cellulare di *binding* del virus dell'epatite B (HBV) nel fegato ⁵⁸. Dal momento che le cellule mononucleate possono essere infettate dall'HBV ^{59,60}, è possibile che anche nelle cellule mononucleate SCCA faccia da recettore di membrana per il virus, permettendone l'internalizzazione. Studi precedenti hanno documentato la localizzazione citosolica di SCCA ⁶¹ e dati più recenti hanno mostrato una localizzazione anche a livello di membrana plasmatica ⁶², suggerendo un possibile ruolo come recettore o come inibitore di proteasi attivo.

Recentemente è stata dimostrata l'iper-espressione di varianti serpiniche diverse, quali SCCA1 e SCCA2, anche nel tumore primitivo del fegato ⁶³. Nell'epatocarcinoma, SCCA contribuisce ad attivare proteine chiave del ciclo cellulare coinvolte nella proliferazione cellulare, induce modificazioni morfologiche e ultrastrutturali tipiche della progressione neoplastica ed inibisce l'apoptosi, *in vitro*. E' stato inoltre documentato che, nel siero di soggetti con HCC, la serpina è presente in associazione a Ig di classe M, sotto forma di immunocomplessi circolanti, dosabili mediante saggi immunoenzimatici (ELISA) ⁶⁴. Dati preliminari evidenziano la sua presenza anche nei linfociti periferici di pazienti con carcinoma squamoso della lingua ⁶⁵.

SCCA è presente fisiologicamente anche nello strato spinoso e granulare di alcuni epiteli squamosi normali (ectocervice, epidermide, esofago, tonsille, ecc.) dove sembra intervenire nella regolazione del differenziamento cellulare. Un aumento del

livello di SCCA è stato osservato anche a livello della cute in caso di alterazioni dermatologiche, quali eczema, pemfigo e psoriasi, patologie polmonari (tubercolosi) e insufficienza renale, il che fa supporre che la serpina svolga un ruolo cruciale durante il processo infiammatorio ^{66, 67}.

3.1.2. Aspetti strutturali e funzionali

L'antigene inizialmente isolato consisteva in un'unica proteina con peso molecolare di circa 45 kDa ⁶⁸; successive analisi hanno permesso di caratterizzare più di dieci frazioni proteiche con diversi punti isoelettrici (PI), compresi tra 5.9 e 6.6. Queste frazioni sono distinte in due gruppi principali: la frazione acida con peso molecolare di 44.5 kDa e punto isoelettrico compreso tra 5.9 e 6.2, la frazione neutra con peso molecolare di 44.9 kDa e punto isoelettrico compreso tra 6.3 e 6.6. ⁶⁹. Tali componenti sono distribuite diversamente nei vari tessuti, in particolare quella acida è presente alla periferia del tessuto tumorale e viene rilasciata in circolo dalle cellule squamose maligne, mentre quella neutra si trova sia in alcuni carcinomi sia negli epitelii squamosi normali ^{70, 71, 72}.

La localizzazione delle due componenti (acida e neutra) corrisponde alla frazione citosolica cellulare ⁶¹, ma la loro presenza in circolo fa pensare all'esistenza di un meccanismo o di secrezione attiva o di rilascio passivo da parte delle cellule che le producono ^{73, 74}.

Il clonaggio del cDNA di SCCA (1190 nucleotidi che codificano per una sequenza di 390 amminoacidi) da parte di Suminami nel 1990 ha permesso di evidenziare che la sequenza amminoacidica è omologa a quella di altre serpine e in particolar modo a quelle appartenenti alla famiglia delle ov-serpine, così chiamate per la somiglianza con l'ovoalbumina ⁷⁵. Nella figura 9 è mostrata la struttura molecolare di SCCA ⁷⁶.

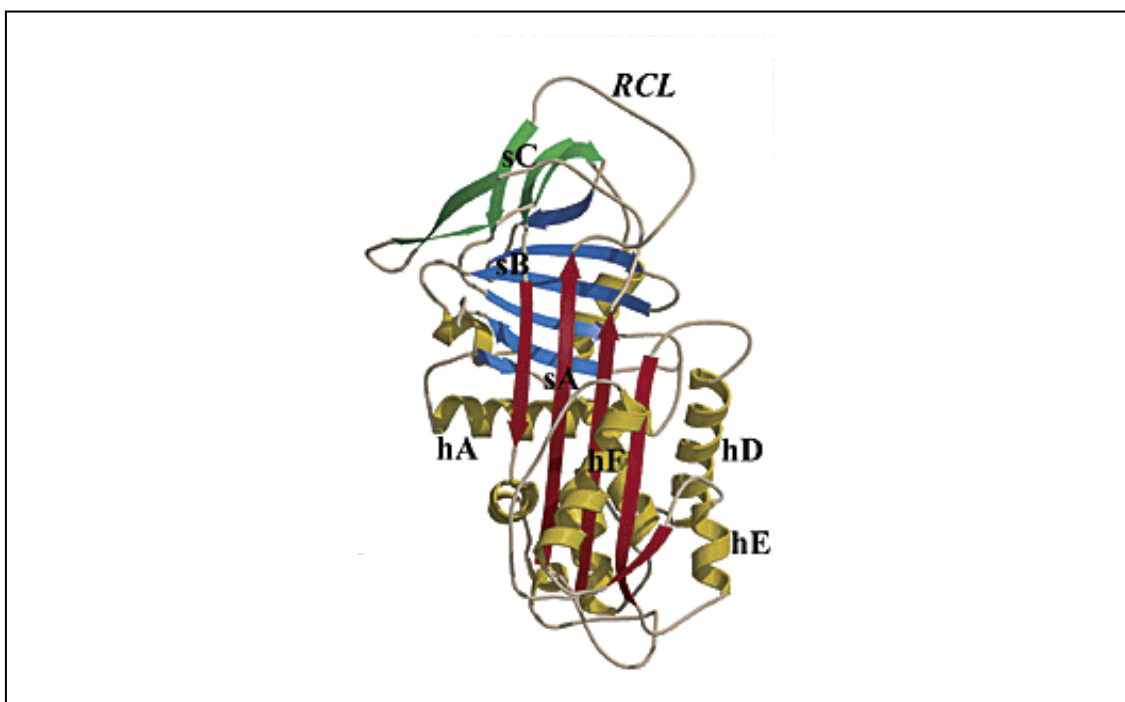


Figura 9. Struttura molecolare di SCCA. Struttura secondaria della serpina SCCA foglietti β (A, B, C) sono mostrati rispettivamente in rosso, blu e verde; le otto α -eliche vanno dalla hA alla hH. Il sito di reazione (RCL), in grigio si trova sulla sommità della molecola [Gettins 2002. *Chem Rev* 102: 4751-4804].

I geni che codificano per SCCA sono due e sono localizzati nel cromosoma 18, nella regione q21.3 di 600 kb ⁷⁷. Questi geni sono distribuiti in tandem sul cromosoma (appaiamento testa-coda): il gene più vicino al centromero codifica l'SCCA isolato inizialmente e successivamente denominato SCCA1, quello più vicino alla regione telomerica codifica per SCCA2 ⁷⁸ (Figura 10). Probabilmente essi derivano da eventi di duplicazione di un gene ancestrale comune ⁷⁹. Sulla base di questo e, tenendo conto dei punti isoelettrici caratteristici di ciascuna frazione, si è concluso che la forma neutra viene codificata dal gene SCCA1 e la forma acida dal gene SCCA2.

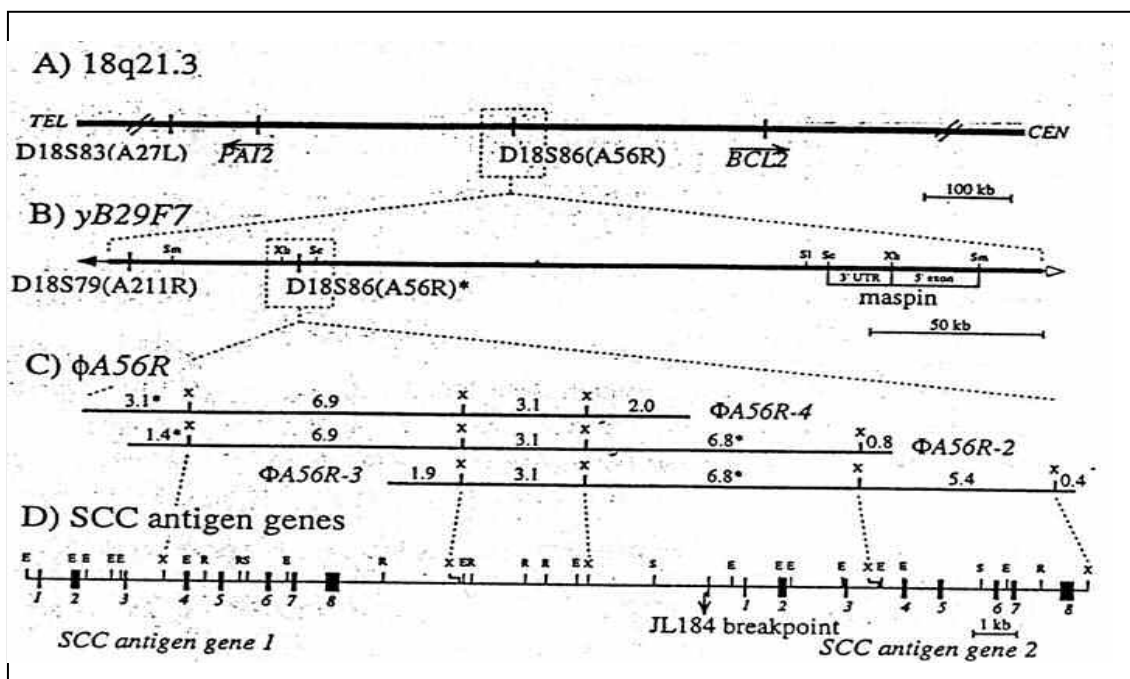


Figura 10. Mappaggio e clonaggio dei geni delle serpine localizzati in 18q21.3. A) Mappa della regione. B) Mappa di yB29F7. C) Cloni del fago A56R . D) Mappa di SCCA1 e SCCA2 [Silverman *et al.*, 1998. *Tum Biol* 19: 480-487].

Le due proteine SCCA1 e SCCA2 mostrano un'elevata omologia di sequenza: infatti, si è visto che i due geni presentano un'omologia di sequenza nucleotidica pari al 98%, mentre le due proteine che codificano sono omologhe al 92% nella sequenza amminoacidica ⁸⁰. Come le altre serpine, SCCA1 e SCCA2 presentano una struttura secondaria che alterna foglietti β ed α eliche. Il centro di reazione (RSL) è caratterizzato da una sequenza amminoacidica conservata, ma esistono delle differenze tra le due proteine. Infatti, SCCA1 a livello del centro di reazione (P1-P1') presenta i residui amminoacidici Ser-Ser, mentre SCCA2 è caratterizzata dai residui Ser-Leu ⁷⁸. Questa sostituzione rende conto della diversa specificità d'azione delle due proteine che, infatti, agiscono su target molecolari diversi.

Ancora oggi, il ruolo svolto da SCCA1 e da SCCA2 non è ben chiaro. Quello che si sa è che esse, come le altre serpine, intervengono nella regolazione dei processi proteolitici andando ad inibire, in maniera irreversibile, alcune proteasi; questa caratteristica funzionale è confermata anche dalla presenza di residui di Alanina nel centro di reazione (P15-P9) che sembrano contribuire in maniera significativa alle funzioni inibitorie delle serpine ⁸¹. I loro bersagli di azione sono comunque diversi e ciò dipende (come detto precedentemente) dalle differenze a livello del centro di reazione. SCCA1 inibisce sia le proteasi seriniche, come la chimotripsina, sia le cisteina proteasi papaina-like, come le cathepsine K, S, I; invece, SCCA2 inibisce le proteasi seriniche chimotripsina-like, come la cathepsina G e la chimotripsina delle mast-cellule ^{82, 83}.

Pertanto, SCCA1 e SCCA2 svolgono un'azione di regolazione della cascata proteolitica che, come è noto, rappresenta un momento fondamentale di numerosi

processi cellulari⁶¹. Questa funzione ha di sicuro delle importanti implicazioni a livello dei processi neoplastici, dal momento che l'equilibrio tra le proteasi ed i loro inibitori può influenzare la mobilità, l'invasività, la proliferazione e la morte cellulare stessa⁷².

Un altro aspetto ancora da delucidare riguarda il ruolo di SCCA negli epitelii squamosi normali. La sua presenza è stata riscontrata soprattutto a livello della cute e dell'ectocervice, dove pare intervenire nella regolazione del differenziamento dell'epitelio squamoso⁸⁴. Sempre a livello della cute, si è osservato un aumento del livello di SCCA anche in caso di eczema e di psoriasi, il che fa supporre un ruolo protettivo svolto dall'antigene durante il processo infiammatorio⁸⁵. Un aumento del titolo di SCCA è stato riscontrato anche in caso di scompensi polmonari quali tubercolosi, cisti bronchiali, sindromi da insufficienza respiratoria negli adulti. Questo significherebbe che SCCA interviene non solo durante la trasformazione neoplastica, ma anche in condizioni fisiologiche normali in particolari tessuti e durante l'infiammazione. La serpina sembra quindi avere in *vivo* un ruolo nella risposta immunitaria sia in condizioni fisiologiche sia durante processi patologici cronici, indicando il suo probabile coinvolgimento nell'immunosorveglianza. Come questo avvenga e quale sia il suo reale significato per il momento non è ancora chiaro. E' stato segnalato che l'insufficienza renale è frequentemente associata a concentrazioni elevate di SCCA, in parte legate a riduzione della *clearance* renale del peptide stesso⁸⁶. Inoltre, le manifestazioni dermatologiche sono frequenti nel Lupus Eritematoso Sistemico (LES) ed esse potrebbero essere riconducibili a livelli elevati di SCCA⁸⁷. Il LES è caratterizzato dall'alternarsi di fasi di attività e di inattività della malattia, il che

ha delle importanti implicazioni prognostiche e terapeutiche. La conoscenza della possibile evoluzione della malattia e della riattivazione sono fondamentali per prevenire danni sistemici irreversibili.

Scopo della tesi

Lo scopo della tesi è:

- ✓ lo studio dell'espressione della serpina SCCA nelle cellule mononucleate di sangue periferico di soggetti infetti da virus dell'epatite C (HCV) ed affetti da Lupus Eritematoso Sistemico (LES);
- ✓ valutare il possibile coinvolgimento di SCCA nel controllo della risposta immunitaria, analizzando la sua espressione nelle cellule mononucleate e le vie di trasduzione del segnale;
- ✓ studiare la correlazione tra livello di espressione di SCCA e attività della malattia;
- ✓ caratterizzare l'espressione di SCCA nei linfociti B di pazienti affetti da infezione HCV ed in pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico (LES) in relazione alle molecole di attivazione delle cellule B.

Materiali e Metodi

4.1. Pazienti

Cellule mononucleate di sangue periferico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) sono state ottenute, previo consenso informato, da 45 pazienti infetti da virus dell'epatite C (HCV), compresi: 14 pazienti con infezione cronica (7 maschi, 7 femmine, età media \pm deviazione standard: 50.4 ± 17.1 anni), 17 pazienti con cirrosi epatica (8 maschi, 9 femmine, età media \pm deviazione standard: 59.5 ± 13.7 anni) e 14 pazienti con carcinoma epatocellulare (7 maschi, 7 femmine, età media \pm deviazione standard: 72.5 ± 6 anni), 12 pazienti con Lupus Eritematoso Sistemico (LES). 24 soggetti sani (10 maschi, 14 femmine, età media \pm deviazione standard: 29.8 ± 6.1 anni) sono stati utilizzati come controlli. Le caratteristiche cliniche e demografiche della popolazione studiata sono riportate nella Tabella 1.

	CONTROLLI	EPATITI CRONICHE	CIRROSI EPATICHE	EPATOCARCINOMA	LES
N° TOTALE	24	14	17	14	12
Sesso (N°)					
Maschi	10	7	8	7	7
Femmine	14	7	9	7	5
Età (media ± DS, anni)	29.8 ± 6.1	50.4 ± 17.1	59.5 ± 13.7	72.5 ± 6	39 ± 5

Tabella 1. Caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti. Sono riportate le caratteristiche cliniche e demografiche della popolazione studiata: controlli, pazienti HCV positivi (epatiti croniche, cirrosi epatiche ed epatocarcinomi) e pazienti LES positivi. L'età è indicata come valore medio ± deviazione standard (DS).

4.2. Anticorpi e reagenti

Per l'analisi dell'espressione di membrana mediante Citometria a Flusso, le cellule sono state marcate con differenti combinazioni di anticorpi monoclonali coniugati con diversi fluorocromi. Di seguito vengono riportati gli anticorpi utilizzati: anti-*human* CD4-phycoerythrin-cyanine-5 (PE-Cy5.5), anti-*human* CD8-phycoerythrin (PE), anti-*human* CD16-PE, anti-*human* CD14-PE, anti-*human* CD19-PE-Cy5.5, anti-*human* CD27-allophycocyanin (APC), anti-*human* CD69-fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-*human* CD71-FITC, anti-*human* CD86-PE e anti-*human* CXCR3-FITC

(tutti gli anticorpi da BD Bioscience, San Josè, CA, USA). Gli anticorpi sono stati utilizzati alle concentrazioni raccomandate dall'azienda produttrice. Per l'identificazione della serpina SCCA è stata effettuata una marcatura indiretta utilizzando l'anticorpo monoclonale anti-*human* SCCA (Xeptagen S.p.A., Marghera, Ve, Italy) alla concentrazione di 8 µg/ml, un anticorpo anti-*human* IgG1 (Caltag, Burlingame, CA) come controllo isotipico e l'anticorpo policlonale anti-*mouse* IgGs-FITC (DakoCytomation, Glostrup, DE). Questi ultimi due anticorpi sono stati utilizzati alle concentrazioni suggerite dal produttore. L'anticorpo monoclonale anti-*human* CD19 coniugato alle microbiglie è stato ottenuto da Miltenyi Biotec (Bergish Galdbach, GE) e le soluzioni Fix and Perm Solutions da Caltag (Burlingame, CA, USA).

Per l'analisi in microscopia confocale, sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: mouse anti-*human* SCCA (Xeptagen S.p.A., Marghera, Ve, Italy), mouse anti-*human* IgG1 (Caltag, Burlingame, CA, USA), goat anti-*mouse* IgGs-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) e mouse anti-*human* CD19 (BD Bioscience, San Josè, CA, USA).

I reagenti utilizzati per l'amplificazione quantitativa di Real-Time PCR sono stati acquistati da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

4.3. Separazione delle cellule

4.3.1. Isolamento delle cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC)

I PBMC sono stati isolati da campioni di sangue periferico anticoagulato mediante centrifugazione in gradiente di densità Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). La vitalità cellulare è stata valutata mediante la tecnica di esclusione del trypan blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

4.3.2. Purificazione dei linfociti B

I linfociti B totali sono stati isolati mediante selezione positiva dalle cellule mononucleate di sangue periferico utilizzando delle microbiglie coniugate all'anticorpo anti-*human* CD19 e le apposite colonne di purificazione MACS (Miltenyi Biotec, Bergish Galdbach, GE), secondo quanto riportato nella scheda tecnica del prodotto. Il controllo della purezza dei linfociti B isolati è stato effettuato mediante l'analisi dell'espressione del marcatore CD19 per i linfociti B ottenuti e del marcatore CD3 per i linfociti non B (frazione negativa). Questa procedura ha documentato una purezza della sospensione cellulare superiore al 95%.

4.4. Analisi in Citometria a Flusso

L'espressione di superficie ed intracitoplasmatica della serpina SCCA nelle diverse sottopopolazioni linfomonocitarie è stata studiata in Citofluorimetria mediante doppia marcatura. Come anticorpo primario è stato utilizzando un anticorpo monoclonale anti-*human* SCCA e come anticorpo secondario un anticorpo anti-*mouse* coniugato al fluorocromo FITC. Al fine di caratterizzare la reattività dei diversi *subset* cellulari alla serpina, le cellule sono state marcate con un pannello di anticorpi monoclonali, ciascuno specifico per il proprio *Cluster of Differentiation* (CD): anti-CD4-PE-Cy5.5, anti-CD8-PE, anti-CD16-PE, anti-CD14-PE e anti-CD19-PE-Cy5.5. In ciascun esperimento, è stata anche valutata la fluorescenza delle cellule incubate con l'anticorpo caratterizzante il controllo isotipico per determinare il livello di autofluorescenza delle cellule

4.4.1. Caratterizzazione dell'espressione di superficie di SCCA

0.5×10^6 PBMC /ml sono stati incubati con l'anticorpo primario monoclonale anti-*human* SCCA (Xeptagen S.p.A., Marghera, Ve, Italy) a temperatura ambiente per 15 minuti, seguito dall'incubazione con l'anticorpo secondario anti-*mouse* IgGs coniugato a FITC (DakoCytomation, Glostrup, DE) a temperatura ambiente per 15 minuti. Il fenotipo delle diverse popolazioni linfomonocitarie è stato determinato mediante l'utilizzo di specifici anticorpi diretti contro i marcatori immunologici: CD8, CD16 e CD14 coniugati al fluorocromo PE, CD4 e CD19 coniugati a PE-Cy5.5. Ogni

esperimento includeva anche cellule incubate con l'anticorpo monoclonale anti-IgG1 come controllo isotipico.

4.4.2. Digestione con tripsina

Per confermare la localizzazione di superficie della molecola SCCA nei linfociti B, l'analisi in Citometria a Flusso è stata effettuata anche sulle cellule B purificate dopotrattamento con tripsina. Le cellule sono state incubate con tripsina allo 0.05% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) per 10 minuti a 37° C. La tripsina è stata poi rimossa e le cellule sono state lavate due volte con PBS prima della marcatura per SCCA. Quest'ultima procedura corrisponde a quella descritta nella sezione 4.4.1. Come controllo, sono stati eseguiti parallelamente degli esperimenti in cui le cellule venivano incubate con il terreno di coltura anzichè con la tripsina.

4.4.3. Caratterizzazione dell'espressione intracitoplasmatica di SCCA

Per l'analisi dell'espressione intracitoplasmatica della serpina, le cellule sono state fissate e permeabilizzate con le soluzioni di fissazione e di permeabilizzazione (Fix and Perm Solutions, Caltag, Burlingame, CA) a temperatura ambiente per 10 minuti prima della marcatura per SCCA.

4.4.4. Associazione con le molecole di attivazione dei linfociti B

Al fine di definire meglio il profilo dei linfociti B esprimenti SCCA a livello di membrana plasmatica, sono stati analizzati i profili di espressione di differenti molecole tipicamente associate all'attivazione delle cellule B. In particolare, è stato utilizzato il seguente pannello di anticorpi monoclonali coniugati a fluorocromi: anti-CD27-APC, anti-CD69-FITC, anti-CD71-FITC per le molecole di attivazione dei linfociti B, anti-CD86-PE per il recettore delle chemochine e anti-CXCR3-FITC per le molecole co-stimolatorie. La procedura di marcatura applicata è la medesima descritta sopra dove agli anticorpi diretti contro i marcatori di membrana sono stati sostituiti da quelli diretti contro le molecole di attivazione. La componente eritrocitaria è stata lisata mediante trattamento della sospensione cellulare con una soluzione di 0.14 M NH_4Cl , 0.017 M Tris-HCl (pH 7.2). Le cellule così marcate sono state lette al citometro FACS Calibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) e la popolazione totale di cellule vitali è stata analizzata in secondo i parametri di Forward Scatter (FSC) e di Side Scatter (SSC).

4.5. Microscopia confocale

La localizzazione a livello cellulare della serpina è stata valutata anche mediante microscopia confocale. I linfociti B purificati sono stati incubati con l'anticorpo monoclonale anti-*human* CD19/FITC (BD Bioscience, San Josè, CA, USA) per 20 minuti, a temperatura ambiente. Dopo due lavaggi con PBS, le cellule B sono state seminate alla concentrazione di 0.3×10^5 /ml, in un volume di 50 μ l/pozzetto, su vetrini precedentemente trattati con poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Le cellule sono state poi fissate aggiungendo paraformaldeide al 4% ed incubando per 10 minuti a temperatura ambiente. Per la localizzazione intracitoplasmatica di SCCA, le cellule fissate sono state lavate due volte con PBS e permeabilizzate con Triton X-100 ambiente. Prima della marcatura per la serpina, i siti di legame proteici aspecifici sono stati saturati mediante incubazione con BSA al 1% per 30 minuti. La marcatura indiretta per la serpina è stata effettuata incubando le cellule con 8 μ g/ml di anticorpo monoclonale anti-SCCA per 20 minuti e, dopo due lavaggi in PBS, con l'anticorpo secondario anti-*mouse* IgGs-FITC (DakoCytomation, Glostrup, DE). La specificità della marcatura è stata controllata utilizzando parallelamente un anticorpo primario (anti-IgG1) della stessa classe isotipica di quello per SCCA. Le cellule così marcate sono state osservate al microscopio confocale Biorad 2001 MP.

4.6. Determinazione quantitativa di SCCA

4.6.1. Estrazione del RNA e reazione di retrotrascrizione

L'RNA totale è stato estratto dai linfociti B purificati (CD19⁺) di 10 controlli, di 10 pazienti LES⁺ e di 10 pazienti HCV⁺, mediante il metodo del Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). I linfociti B sono stati incubati con 1 ml Trizol/8 x 10⁶ cellule per 5 minuti a temperatura ambiente (fase di omogeneizzazione) seguita dall'incubazione con 0.2 ml di cloroformio per 15 minuti (fase di separazione). Dopo aver centrifugato i campioni a 12.000 x g per 15 minuti a + 4°C, l'RNA è stato precipitato in 0.5 ml di alcol isopropilico per 10 minuti (fase di precipitazione), seguita dalla centrifugazione a 12.000 x g per 10 minuti a + 4°C. Il pellet ottenuto è stato lavato con 1 ml di etanolo al 70% freddo e centrifugato a 7.500 x g per 5 minuti a + 4°C (fase di lavaggio). L'RNA è stato risospeso in acqua DEPC e la purezza ($A_{260}/A_{280} \geq 1.8$) è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica (Beckman DU530). L'RNA estratto e quantificato è stato retrotrascritto a DNA complementare (cDNA). Inizialmente è stato digerito il DNA residuo trattando 1 ug di RNA/campione con 1 µl Deoxyribonuclease I, Amplification Grade, 1 µl Dnase I, Reaction Buffer 10X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in acqua DEPC a temperatura ambiente per 15 minuti. I campioni sono stati poi incubati con 1 µl di EDTA 25 mM per 10 minuti a 65°C. Sono stati aggiunti 1 µl di Oligo dT (500 ug/ml) e 1 µl di DNTP 10 mM e la soluzione è stata mantenuta a 65°C per 5 minuti. Il cDNA è stato dunque sintetizzato a partire dal RNA utilizzando 4 µl di First-Strand Buffer 5X, 2 µl di DTT 0.1 M, 1 µl di RNase OUT e RT Superscript II

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) alla concentrazione di 200 unità/ug. La mix è stata incubata a 42° C per 50 minuti e mantenuta a – 80° C fino all'utilizzo.

4.6.2. Real-Time polymerase chain reaction (PCR)

La reazione di amplificazione quantitativa (Real-time PCR) è stata effettuata con lo strumento LightCycler® (Roche, Mannheim, GE). A questo proposito, sono stati disegnati specifici primers per la serpina SCCA1 avvalendosi del programma Primer3 (versione 0.4.0). Di seguito vengono riportate le sequenze dei primers usati: (470-490) forward 3'-GCAAATGCTCCAGAAGAAAG-5', (710-730) reverse 3'-CGAGGCAAAATGAAAAGATG-5'. La mix di reazione (20 µl) era così costituita: 4 µl di FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I master Mix (Roche, Mannheim, GE), 0.25 µl di ciascun primer 20 µM, 1 µg di DNA dei linfociti B o dello standard. Le condizioni di amplificazione utilizzate sono state le seguenti: 95° C per 10 minuti seguiti da 45 cicli a 94° C per 10 secondi, a 58° C per 10 secondi, a 72° C per 10 secondi e a 37° C per 30 secondi. La concentrazione del cDNA di SCCA è stata determinata generando una curva di taratura mediante 6 diluizioni seriali del plasmide contenente il gene per SCCA1 (p25-SCCA).

Samples were tested in duplicate and each PCR run included a negative control, as well as blank (water) sample to check for PCR contamination.

4.7. Analisi dei dati

Per l'analisi degli eventi acquisiti al FACS è stato utilizzato il programma Macintosh CellQuest software program (Becton Dickinson).

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando i pacchetti applicativi GraphPad View versione 4.0 e Statistica versione 7.1 per Microsoft. I dati ottenuti sono stati elaborati statisticamente e valutati secondo il test di Fisher, di Mann Whitney a e la correlazione di Pearson quando opportuno. La normalità dei campioni è stata valutata secondo il test di Kolmorov-Smirnov. Per tutte le analisi è stato calcolato il valore di P e valori di $P \leq 0.05$ sono stati considerati significativi.

Risultati

5.1. Caratterizzazione dell'espressione di SCCA nei diversi tipi di cellule linfomonocitarie

5.1.1. SCCA di superficie

Per definire la distribuzione della serpina SCCA nelle diverse classi di cellule mononucleate di sangue periferico, è stata analizzata la sua espressione a livello di membrana cellulare e di citoplasma mediante Citometria a Flusso.

In termini di numerosità dei linfociti totali, i soggetti sani hanno mostrato la stessa frequenza dei pazienti con infezione da virus C, mentre i pazienti con LES hanno mostrato una ridotta frequenza di linfociti periferici (dati non mostrati), in accordo con quanto riportato in studi precedenti^{88, 89}. Come riportato nella figura 11, SCCA è risultata espressa sulla superficie dei linfociti B nel 68% dei controlli, mentre la percentuale di pazienti HCV positivi che esprimevano la serpina è risultato significativamente diminuito (38% epatite cronica, $P = 0.05$; 47%; cirrosi epatica, $P = 0.068$; 27% epatocarcinoma, $P = 0.0068$). Al contrario, nei pazienti affetti da LES, SCCA non è risultata espressa in nessuno dei soggetti analizzati ($P = 0.0000$). Per quanto concerne le altre popolazioni cellulare considerate (monociti, linfociti T e cellule

Natural Killer), nessuna differenza tra i controlli ed i pazienti, sia HCV positivi sia affetti da LES, è stata riscontrata .

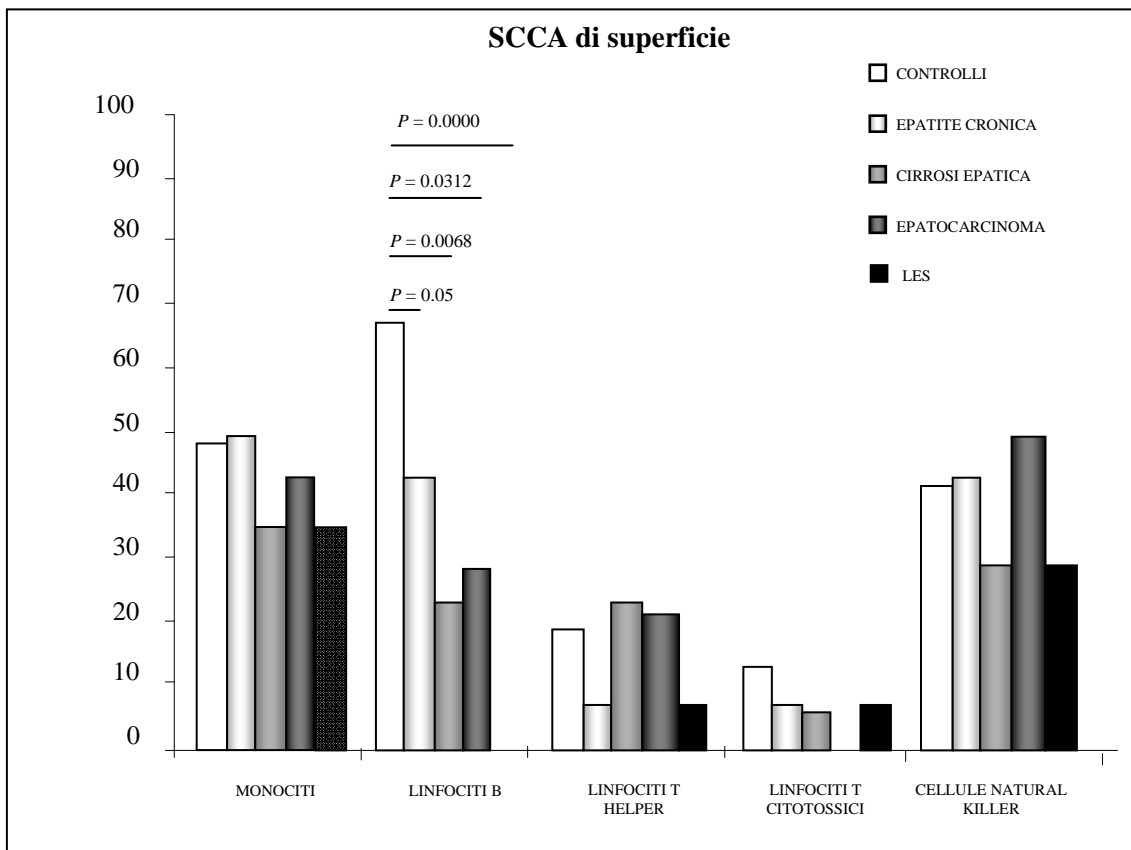


Figura 11. Distribuzione di superficie di SCCA nei PBMC. L'espressione di SCCA sulla superficie delle cellule mononucleate dei soggetti sani, dei pazienti HCV e LES positivi è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica, utilizzando un anticorpo monoclonale anti-SCCA. I diversi sottotipi cellulari sono stati identificati utilizzando un pannello di anticorpi, ciascuno specifico per il proprio *Cluster of Differentiation* (anti-CD4, anti-CD8, anti-CD14, anti-CD16 e anti-CD19). In ordinata: percentuale di soggetti positivi per SCCA sulla superficie delle cellule mononucleate. I valori di P sono stati calcolati con il test di Fisher; $P < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Nell'ambito dei soggetti che hanno mostrato una reattività per SCCA sulla superficie dei linfociti B, la maggiore reattività dei soggetti sani per SCCA è risultata essere associata con un aumento dell'entità di espressione della serpina negli stessi, rispetto ai pazienti HCV positivi. In particolare, sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi di pazienti (epatite cronica *vs* controlli, $P = 0.0378$; cirrosi epatica *vs* controlli, $P = 0.0426$; epatocarcinoma *vs* controlli, $P = 0.0209$), in associazione con il grado di progressione della malattia, come riportato nella figura 12.

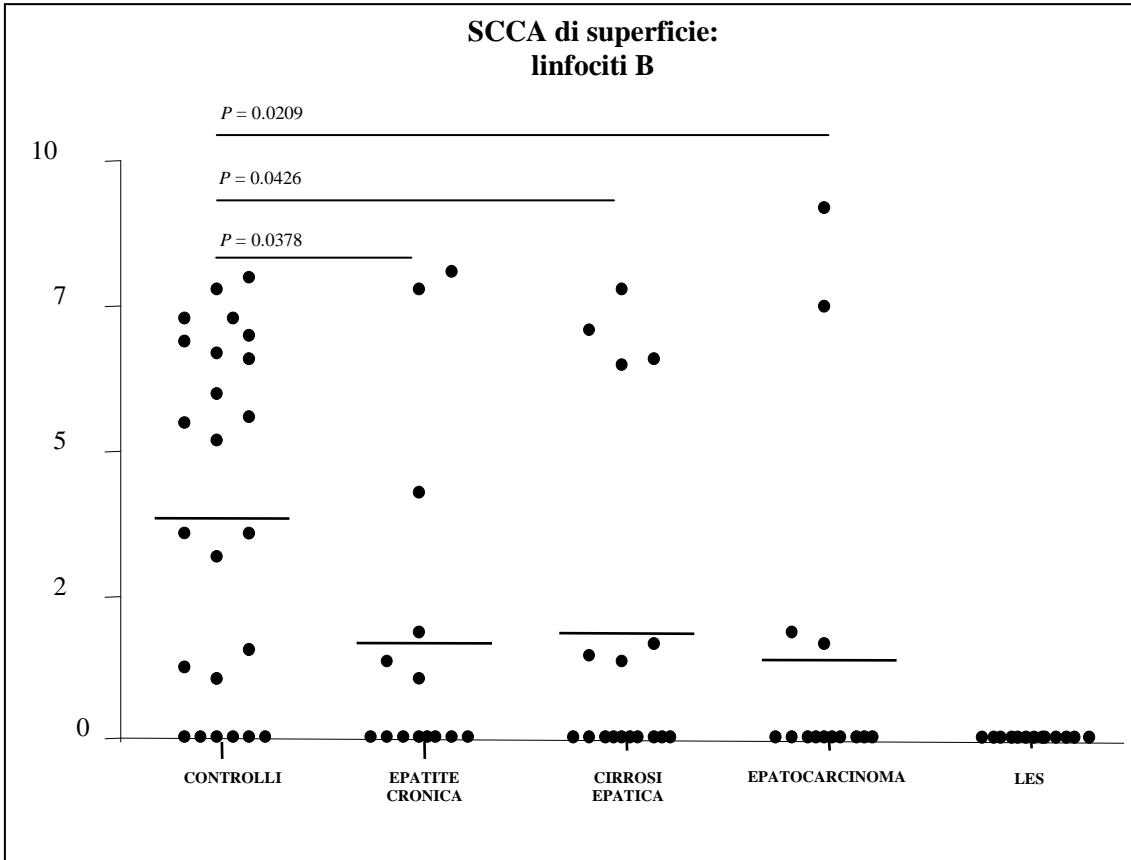


Figura 12. Espressione di SCCA nei diversi gruppi di pazienti. L'espressione di SCCA sulla superficie delle cellule mononucleate dei soggetti sani, dei pazienti HCV e LES positivi è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica. Le cellule esprimenti SCCA sono state calcolate come percentuale dei linfociti B CD19 positivi che esprimevano SCCA. In ordinata: espressione di SCCA sulla superficie dei linfociti B. Le linee attraverso ciascuna colonna rappresentano il valore medio di espressione per ogni gruppo. I valori di P sono stati calcolati con il test di Mann-Whitney; $P < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

5.1.2. SCCA intracitoplasmatica

Per quanto riguarda l'espressione intracitoplasmatica di SCCA, la maggiore reattività per la serpina è stata riscontrata nelle cellule Natural Killer dei pazienti con epatocarcinoma (epatocarcinoma *vs* controlli, $P = 0.005$). Le differenze di reattività per SCCA nei pazienti con epatocarcinoma, sono state documentate anche rispetto agli altri due gruppi di soggetti HCV positivi (epatocarcinoma *vs* epatiti cronica, $P = 0.0064$; epatocarcinoma *vs* cirrosi epatica, $P = 0.0275$). Al contrario, i pazienti con LES non hanno dimostrato nessuna significativa differenza di reattività rispetto ai soggetti controllo. Inoltre, nessuna differenza significativa è stata osservata negli altri tipi cellulari (Figura 13).

Anche in relazione all'espressione intracitoplasmatica di SCCA è stata considerata l'entità di espressione della serpina. In particolare, i pazienti con epatocarcinoma hanno mostrato, a livello delle cellule Natural Killer, valori superiori in termini di entità di espressione (epatocarcinoma *vs* controlli, $P = 0,0057$; epatocarcinoma *vs* epatite cronica, $P = 0.0426$; epatocarcinoma *vs* cirrosi epatica, $P = 0.0132$), come riportato nella figura 14. I pazienti con LES non hanno documentato nessuna differenza, rispetto ai soggetti di controllo, in termini di espressione di SCCA.

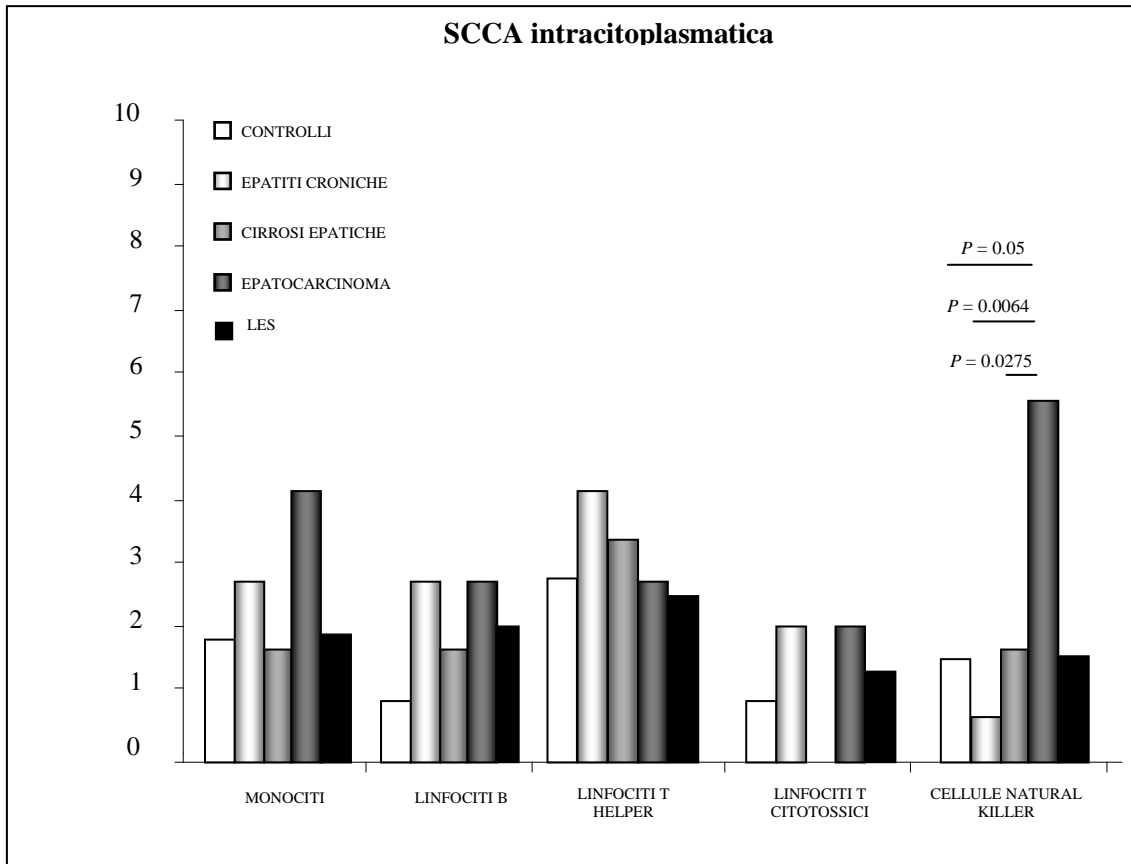


Figura 13. Distribuzione intracitoplasmatica di SCCA nei PBMC. L'espressione di SCCA nel citoplasma delle cellule mononucleate dei soggetti sani, dei pazienti HCV e LES positivi è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica, utilizzando un anticorpo monoclonale anti-SCCA. I diversi sottotipi cellulari sono stati identificati utilizzando un pannello di anticorpi, ciascuno specifico per il proprio *Cluster of Differentiation* (anti-CD4, anti-CD8, anti-CD14, anti-CD16 e anti-CD19). In ordinata: percentuale di soggetti positivi per SCCA a livello citoplasmatico nelle cellule mononucleate. I valori di P sono stati calcolati con il test di Fisher; $P < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

5.2. Localizzazione di SCCA sulla superficie dei linfociti B

5.2.1. Microscopia confocale

La localizzazione a livello cellulare di SCCA è stata determinata mediante analisi in microscopia confocale sui linfociti B purificati, in un gruppo di 10 soggetti sani, di 10 pazienti HCV positivi e di 10 LES positivi.

Come riportato nella figura 15, la serpina SCCA è presente a livello di membrana plasmatica delle cellule B purificate, mentre a livello citoplasmatico la sua espressione è trascurabile.

5.2.2. Citometria a Flusso: trattamento con tripsina

Per verificare ulteriormente la localizzazione di superficie di SCCA nei linfociti B purificati, è stata valutata l'espressione della serpina in citofluorimetria dopo trattamento delle cellule con tripsina. Come riportato nella figura 16, in seguito al trattamento con tripsina, è stata documentata una riduzione della reattività per SCCA rispetto a quanto osservato nelle cellule non trattate di controllo.

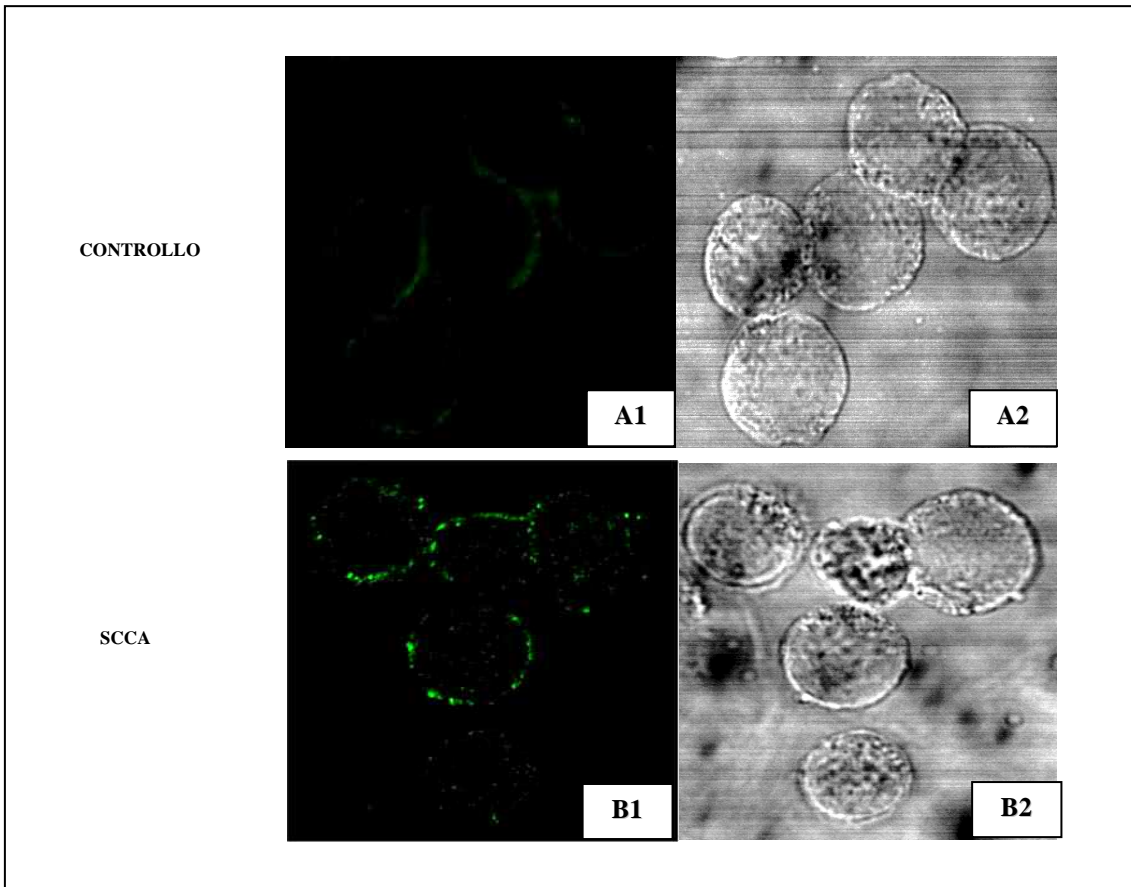


Figura 15. Localizzazione di SCCA nei linfociti B purificati mediante microscopia confocale. La localizzazione di superficie della serpina è stata valutata mediante microscopia confocale in linfociti B purificati. In questa figura è rappresentata un'immagine ottenuta dall'analisi microscopica sui linfociti B di un soggetto sano. Le cellule sono state marcate con un anticorpo monoclonale anti-SCCA (A1) e la specificità della marcatura è stata verificata utilizzando un anticorpo anti-IgG1 come controllo isotipico (A2). A destra sono riportate le rispettive immagini in campo chiaro (B1 e B2). Ingrandimento originale x 60.

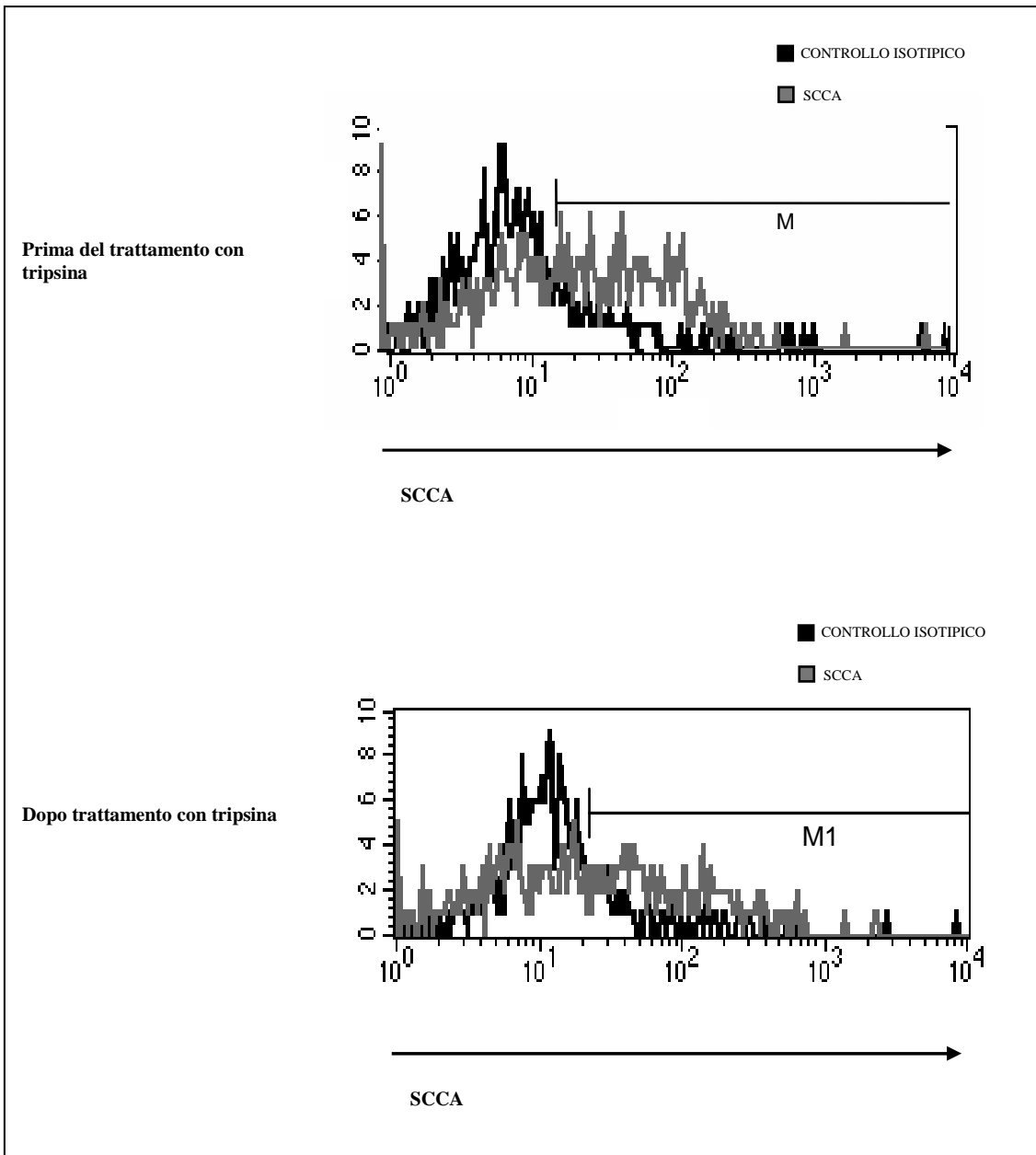


Figura 16. Effetto del trattamento con tripsina su SCCA di superficie in linfociti B purificati. Analisi citofluorimetrica del profilo di espressione di SCCA di superficie in cellule B prima e dopo digestione con tripsina. Una riduzione dell'espressione di SCCA è stata osservata dopo trattamento con l'enzima.

5.3. Determinazione quantitativa del RNA di SCCA nei linfociti B purificati: Real-time PCR

L'RNA di SCCA è stato quantificato mediante Real-time PCR al fine di verificare l'attivazione a livello trascrizionale del gene per SCCA. A questo proposito sono stati analizzati 10 soggetti sani, 10 pazienti HCV positivi e 10 pazienti con LES.

Come riportato nella figura 17, l'amplificazione degli acidi nucleici ha documentato una maggiore attività trascrizionale nei linfociti dei controlli rispetto ai pazienti HCV positivi. L'attività trascrizionale nei pazienti con LES è risultata trascurabile.

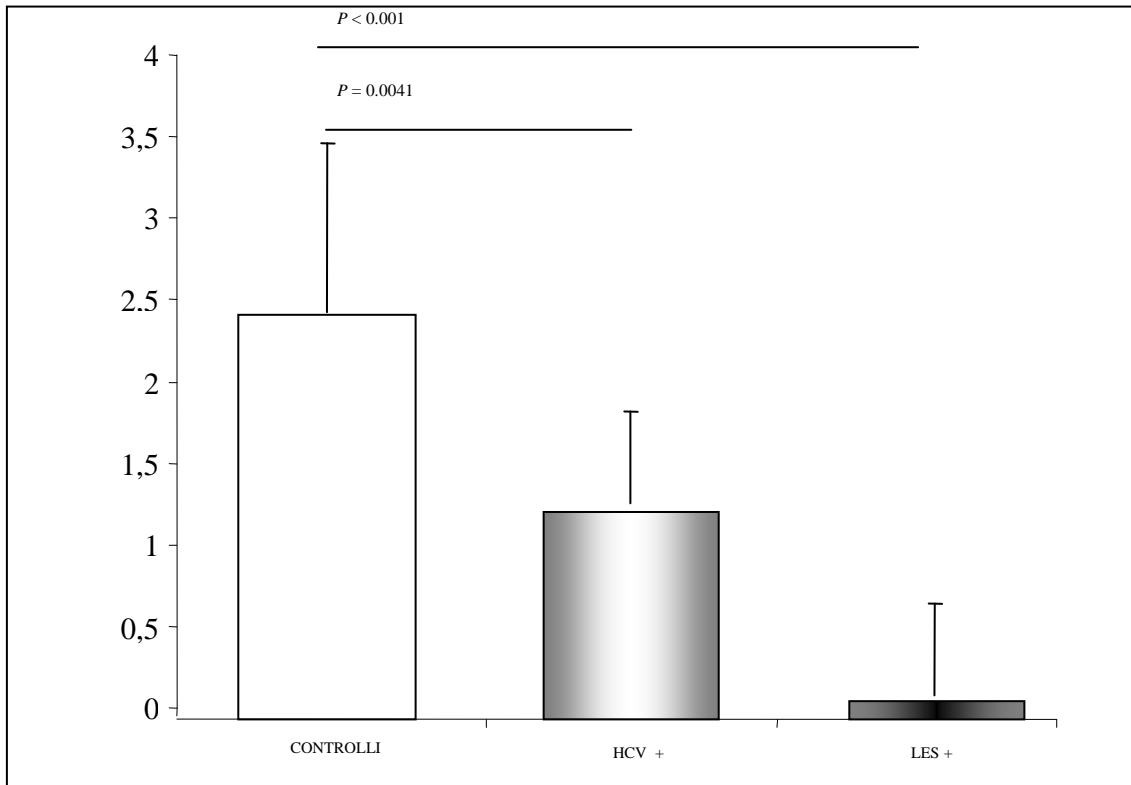


Figura 17. Real-time PCR per SCCA nei linfociti B purificati. L'RNA di SCCA è stato quantificato mediante real-time PCR in linfociti B purificati di soggetti sani, di pazienti HCV positive e di pazienti con LES.

In ordinata: N° copies/100 ng total RNA x 10^{26} . Le colonne rappresentano i valori medi e le barre di errore rappresentano le deviazioni standard (DS). La concentrazione di SCCA è stata normalizzata rispetto all'RNA totale.

5.4. Espressione di SCCA e marcatori di attivazione nei linfociti B

Con lo scopo di definire l'espressione della serpina SCCA in relazione al profilo di attivazione dei linfociti B, sono stati analizzati differenti marcatori di attivazione dei linfociti B, mediante Citometria a Flusso. In questa fase dello studio sono stati considerati solo i pazienti HCV positivi, dal momento che i risultati precedenti avevano documentato la mancata di espressione di SCCA sulla superficie dei linfociti B nei pazienti con LES. Le molecole analizzate sono le seguenti: CD27, CD69, CD71, CD86 e CXCR3.

Come mostrato nella figura 18, nessuna differenza significativa tra i soggetti di controllo ed i pazienti è stata documentata in relazione all'espressione delle molecole CD69, CD71, CD86 e CXCR3, sia nelle cellule CD19⁺/SCCA⁺ che in quelle CD19⁺/SCCA⁻. Al contrario, i valori di espressione della molecola CD27 sono risultati significativamente più elevati nei linfociti B positivi per SCCA dei controlli rispetto alle cellule B dei pazienti HCV positivi ($P = 0.0408$, Figura 8), mentre nessuna differenza è stata osservata tra i due gruppi nelle cellule B negative per SCCA (Figura 19).

Inoltre, è stata documentata una correlazione diretta ($r = 0.98$) tra l'entità di espressione di SCCA e la reattività per la molecola CD27 (Figura 20).

In accordo con i precedenti risultati, l'analisi dell'espressione di CD27 nei linfociti B dei pazienti ha mostrato che la frequenza delle cellule B positive per CD27 negli HCV + è significativamente inferiore rispetto a quanto trovato nei soggetti sani ($P = 0.0085$, Figura 21).

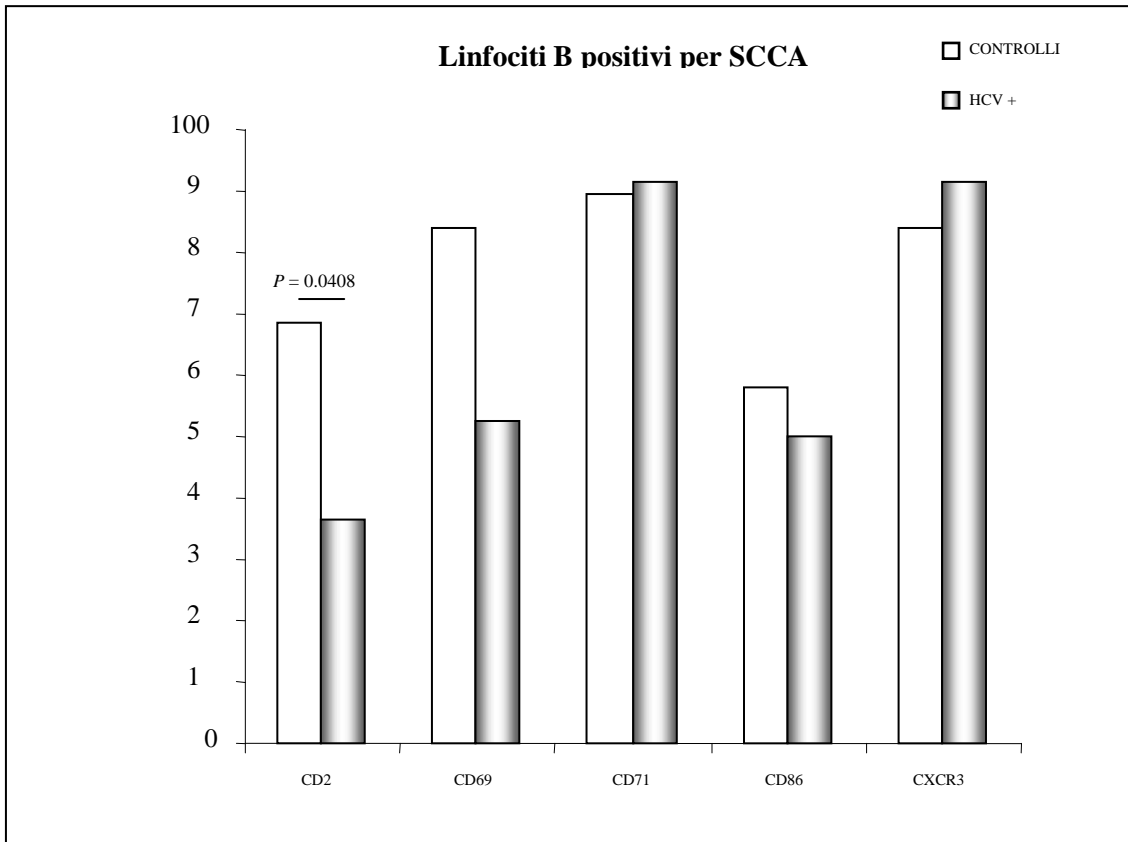


Figura 18. Distribuzione delle molecole di attivazione dei linfociti B in relazione all'espressione di SCCA.

In ordinata: percentuale di soggetti positive per i diversi marcatori di attivazione sulla superficie dei linfociti B. Le colonne rappresentano la percentuale di linfociti B CD19⁺/SCCA⁺ per ciascuna molecola di attivazione. I valori di *P* sono stati calcolati con il test di Fisher; *P* < 0.05 è stato considerato significativo.

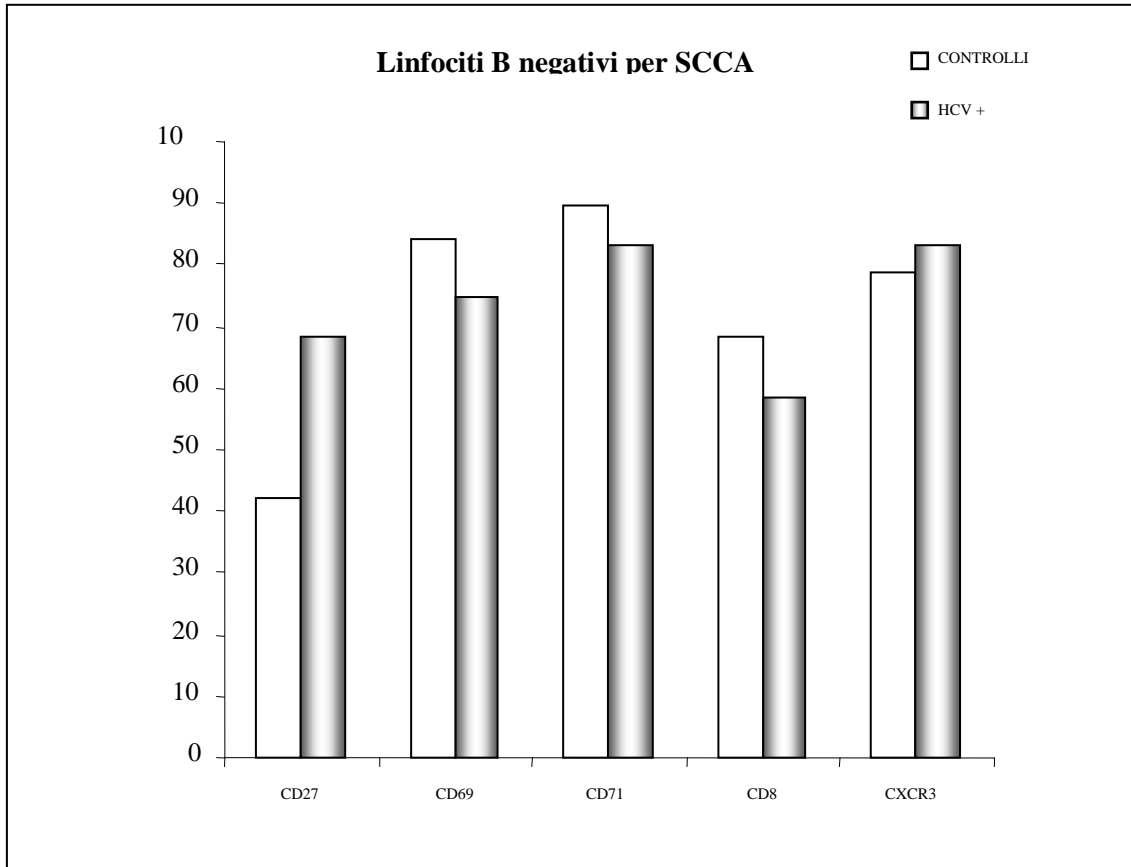


Figura 19. Distribuzione delle molecole di attivazione dei linfociti B in relazione all'espressione di SCCA.

In ordinata: percentuale di soggetti positive per i diversi marcatori di attivazione sulla superficie dei linfociti B. Le colonne rappresentano la percentuale di linfociti B CD19⁺/SCCA⁻ per ciascuna molecola di attivazione. I valori di *P* sono stati calcolati con il test di Fisher; *P* < 0.05 è stato considerato significativo

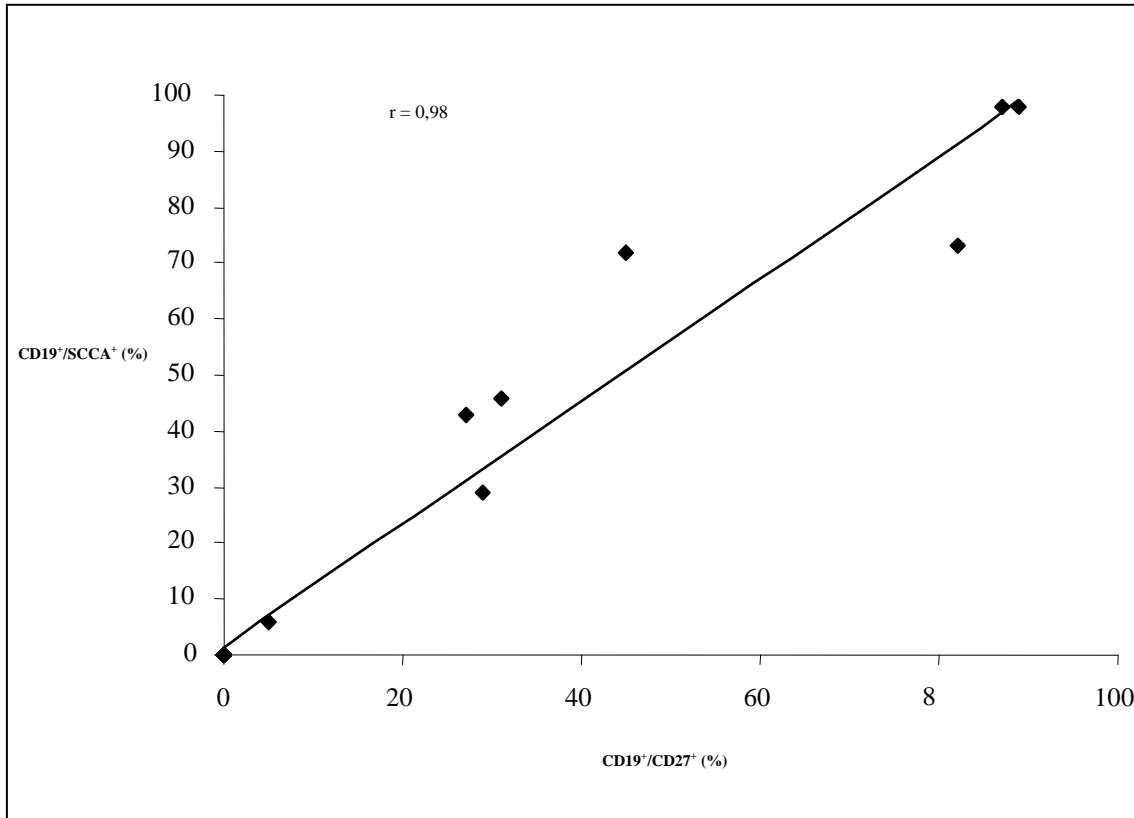


Figura 20. Marcatore di attivazione CD27 ed SCCA nei linfociti B nei soggetti sani e nei pazienti HCV positivi.. Correlazione tra i linfociti B CD19⁺/SCCA⁺ ed i linfociti B CD19⁺/CD27⁺. I valori di *P* sono stati calcolati con il test di the Mann-Whitney; *P* < 0.05 è stato considerato significativo.

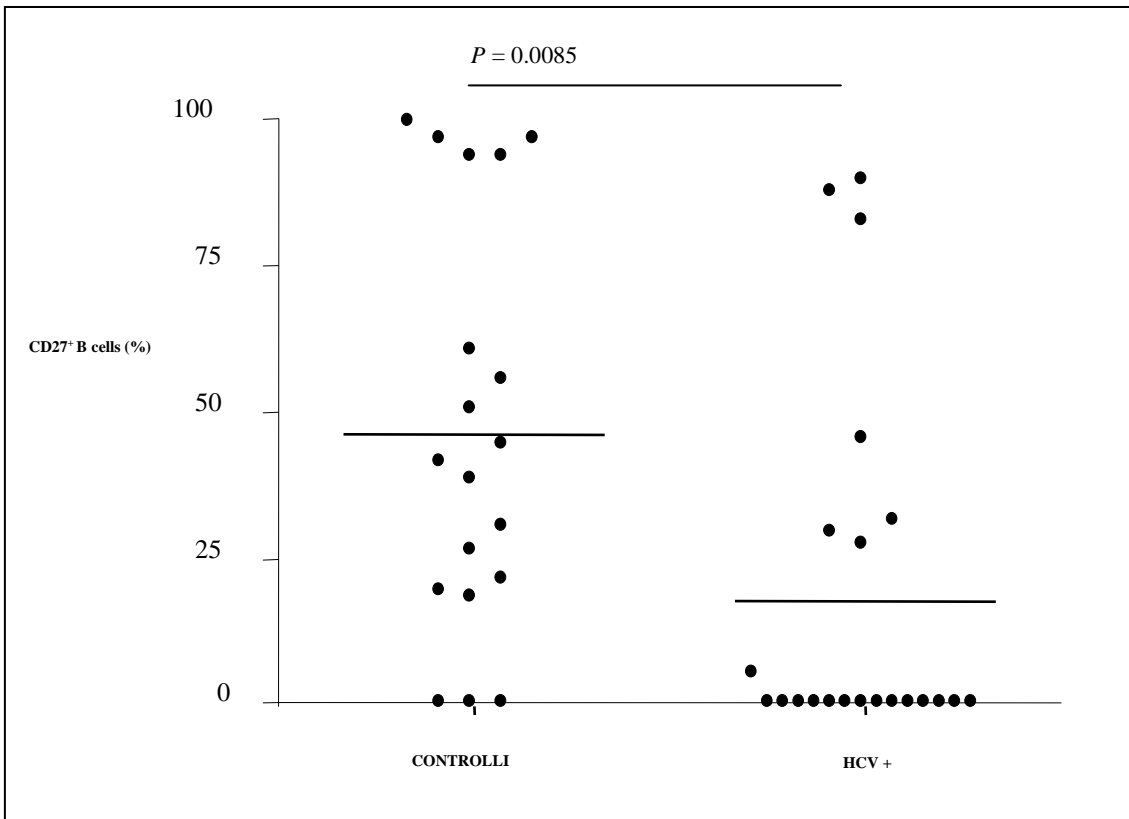


Figura 21. Distribuzione della frequenza di CD27 sui linfociti B nei soggetti sani e nei pazienti HCV positivi. Le linee attraverso ciascuna colonna rappresentano il valore medio per ogni gruppo. I valori di P sono stati calcolati con il test di the Mann-Whitney; $P < 0.05$ è stato considerato significativo.

Discussione

L'infezione da virus dell'epatite C (HCV) è caratterizzata da un'elevata tendenza alla cronicizzazione il cui risultato è lo sviluppo di malattie croniche del fegato che possono evolvere in cirrosi epatica ed epatocarcinoma ⁹⁰. L'HCV è in grado di sviluppare diverse strategie per eludere l'eliminazione del virus da parte del sistema immunitario dell'ospite stabilendo quindi un'infezione persistente dove l'evoluzione del quadro clinico dipende da complesse interazioni tra il virus ed il sistema immunitario dell'ospite.

Molti studi hanno documentato l'importanza della risposta immunitaria T-dipendente nel controllo dell'infezione virale ⁹¹, mentre il ruolo della risposta immunitaria mediata dai linfociti B non è stato ampiamente studiato. Infatti, benché siano state descritte molteplici alterazioni dei linfociti B in corso di infezione cronica da HCV, il ruolo dei linfociti B nella mancata eliminazione del virus è ancora largamente sconosciuta.

Il Lupus Eritematoso Sistemico (LES) è una malattia infiammatoria cronica multifattoriale che coinvolge diversi organi. È caratterizzato da una patogenesi autoimmune, da diverse manifestazioni d'organo e dalla produzione di auto-anticorpi. Diversi studi documentano delle alterazioni nell'omeostasi dei linfociti B nel LES, come l'espressione aberrante di recettori o l'attivazione di vie di traduzione del segnale che controllano la proliferazione e il differenziamento delle cellule B, la produzione di

anticorpi e l'apoptosi, suggerendo un ruolo chiave dei linfociti B nell'immunopatogenesi del LES. Non è ancora chiaro il perché di una così elevata produzione di auto-anticorpi; a questo proposito, sono state avanzate diverse ipotesi che comprendono la stimolazione aspecifica dei linfociti B (attivazione policlonale) forse da parte di Heat Shock Protein e l'intervento dei linfociti T. Quest'ultima ipotesi è sostenuta dal fatto che gli auto-anticorpi nel LES derivano da un riarrangiamento genico e da mutazioni somatiche tipiche di una risposta indotta da antigeni ^{46, 47}.

Il ruolo biologico dell'inibitore di proteasi seriniche Squamous Cell Carcinoma Antigen (SCCA) è stato ampiamente studiato negli ultimi decenni, ma molti aspetti rimangono tuttora poco chiari. In particolare, SCCA è stata trovata in cellule di tipo neoplastico in tessuti di origine epiteliale e recentemente è stata documentata la sua presenza anche in linfociti periferici di pazienti neoplastici ⁶⁵. Gli effetti biologici di questa molecola non sono ancora stati del tutto definiti, sebbene diversi studi hanno riportato un'augmentata resistenza all'apoptosi conferita da SCCA ⁵⁷ e dati preliminari supportano il suo ruolo nel controllo della proliferazione cellulare e della metastatizzazione ⁹².

SCCA è presente fisiologicamente anche nello strato spinoso e granulare di alcuni epitelii squamosi normali (ectocervice, epidermide, esofago, tonsille, ecc.) dove sembra intervenire nella regolazione del differenziamento cellulare. Un aumento del livello di SCCA è stato osservato anche a livello della cute in caso di alterazioni dermatologiche, quali eczema, pemfigo e psoriasi, patologie polmonari (tubercolosi) e insufficienza renale, il che fa supporre che la serpin svolga un ruolo cruciale durante il

processo infiammatorio ^{66, 67}. Data la mancanza di certezze circa il meccanismo patogenetico del LES, in passato sono stati utilizzati diversi antigeni di superficie (es. CA 125, CD27) come indice di attivazione dei linfociti T e della malattia stessa, ma nessuno ha dato risultati soddisfacenti ⁹³. Proprio per la sua interazione con cellule del Sistema Immunitario in caso di infezioni virali (HCV), SCCA potrebbe agire modulando la risposta immunitaria anche nel LES e questo potrebbe contribuire a spiegare, in modo innovativo, altri aspetti della patogenesi a base immunologica. E' stato segnalato che l'insufficienza renale è frequentemente associata a concentrazioni elevate di SCCA, in parte legate a riduzione della *clearance* renale del peptide stesso ⁹⁴. Inoltre, le manifestazioni dermatologiche sono frequenti nel LES ed esse potrebbero essere riconducibili a livelli elevati di SCCA ⁸⁷.

Il presente studio è stato condotto allo scopo di valutare l'espressione di SCCA nelle Cellule Mononucleate di Sangue Periferico di pazienti con infezione da virus dell'epatite C a diversi gradi di malattia ed in pazienti affetti da *Lupus Erythematosus Multisistemico* (LES), in relazione alle molecole di attivazione delle cellule B.

I risultati ottenuti hanno mostrato la presenza della serpina sulla membrane e nel citoplasma di diversi tipi di cellule linfomonocitarie. In particolare, la classe cellulare in cui SCCA è risultata essere espressa a livelli elevati è proprio quella dei linfociti B. Infatti, la maggior parte dei soggetti sani ha documentato una reattività per SCCA sulla superficie delle cellule B, mentre nei pazienti con infezione da HCV la percentuale di positività è risultata significativamente diminuita e associata ad una minore entità di espressione della serpina stessa.. Nei pazienti con LES non è stata documentata nessuna reattività per la serpina sulla superficie dei linfociti B.

Nelle altre sottoclassi linfomonocitarie, SCCA è stata frequentemente trovata sulla superficie dei monociti e delle cellule Natural Killer, senza differenze tra i soggetti sani ed i pazienti, sia HCV positivi sia LES positivi.

I risultati ottenuti dopo amplificazione quantitativa tramite real-time PCR hanno evidenziato la trascrizione attiva della serpina nelle cellule B purificate, escludendo quindi la possibilità di un suo legame passivo sul lato esterno della membrana plasmatica. I soggetti con LES hanno mostrato una trascurabile attività trascrizionale, indicando quindi che la mancata reattività dei linfociti B per la serpina è dovuta all'assenza di attività trascrizionale per la stessa.

La localizzazione di SCCA sulla superficie dei linfociti B è stata confermata anche dalla microscopia confocale e dall'analisi in citometria dell'espressione della serpina dopo digestione triptica. Questi risultati confermano la localizzazione cellulare di questa molecola che, studi precedenti, riportavano a livello citoplasmatico⁶¹, sebbene fosse anche stata riportata in precedenza una sua localizzazione sulla membrana plasmatica^{58, 62}.

Per definire ulteriormente l'espressione di SCCA sui linfociti B, sono state analizzate delle molecole di attivazione delle cellule B nelle popolazioni cellulari positive e negative per la serpina. Sebbene alcuni studi riportino livelli ridotti della molecola CD27 nei linfociti B circolanti³², l'analisi citofluorimetrica ha mostrato che l'espressione di SCCA è direttamente correlata con i livelli di CD27, un molecola appartenente alla famiglia dei recettori del TNF, tipicamente associata alla maturazione dei linfociti B e alla evoluzione in cellule della memoria⁹⁵. Nessuna differenza tra i

controlli ed i pazienti è stata osservata per le altre molecole di attivazione analizzate (CD69, CD71, CD86 e CXCR3).

Nei pazienti HCV infetti, la ridotta espressione di SCCA è risultata essere associata con una parallela diminuzione dei valori di CD27, indicando un possibile coinvolgimento della serpina nella deregolazione del processo maturativo dei linfociti B. Risultati contrastanti sono stati riportati in letteratura sulla frequenza di espressione dei linfociti B CD27⁺ nei pazienti con infezione da HCV. Quando espressi come percentuale dei linfociti totali periferici, è stato descritto un aumento della loro frequenza³², mentre frequenze minori rispetto ai soggetti sani sono state documentate da altri autori^{96, 97}. I risultati esposti nel presente studio, sono in accordo con quanto riportato dagli autori che indicano una minore attivazione delle cellule B della memoria nei soggetti infetti da HCV rispetto ai controlli sani. Nel complesso, questi dati suggeriscono che, in corso di infezione da virus dell'epatite C, SCCA potrebbe essere coinvolta nei difettimaturativi dei linfociti B.

Il ruolo dei linfociti B nell'infezione da epatite C è stato poco considerato in passato, ma in un recente lavoro vengono considerate ampiamente le svariate funzioni dei linfociti B nell'infezione cronica da HCV, evidenziando l'importanza di questa risposta immunitaria³⁴. I nostri dati indicano che la riduzione dell'espressione della serpina non è associata con il grado di progressione della malattia o lo sviluppo di epatocarcinoma, suggerendo quindi un ruolo di SCCA nella persistenza del virus e nei difetti alla base della mancata eliminazione del virus da parte del sistema immunitario. La deregolazione di SCCA potrebbe dunque rappresentare uno dei molteplici meccanismi utilizzati dal virus per eludere il controllo immunitario.

Nei pazienti con *Lupus Erythematosus Multisistemico* la serpina SCCA non è risultata espressa sulla superficie dei linfociti B e la frequenza delle cellule B CD27⁺ è risultata diminuita, come diversi studi presenti in letteratura hanno documentato in passato ⁹⁸. Il ruolo dei linfociti B nel LES è stato ampiamente descritto in precedenza e negli ultimi anni è stata documentata l'importanza delle cellule B della memoria nei meccanismi di risposta autoimmune ⁹⁹. La mancata reattività delle cellule B per la serpina potrebbe rappresentare un elemento di lettura del deficit maturativo dei linfociti B riscontrato in corso di una malattia a patogenesi autoimmune quale il LES.

A livello citoplasmatico è stato trovato un incremento della reattività per la serpina nelle cellule natural killer di pazienti con epatocarcinoma, con valori significativamente superiori rispetto a quelli riscontrati negli altri due gruppi di pazienti. Questo aspetto suggerisce che l'incremento di espressione di SCCA sia legato al processo neoplastico più che all'infezione virale. Ad ogni modo questo aspetto sarà oggetto di ulteriori studi. Al contrario, i pazienti con LES non hanno dimostrato nessuna significativa differenza di reattività rispetto ai soggetti controllo, suggerendo quindi che le cellule NK non hanno una relazione diretta con la serpina.

I risultati ottenuti indicano che la serpina SCCA è espressa fisiologicamente sulla superficie dei linfociti B della memoria (CD27⁺) e che l'infezione da virus dell'epatite C è associata ad una marcata riduzione della popolazione di cellule B CD27⁺/SCCA⁺. Inoltre, nei pazienti con LES la serpina non è risultata essere espressa a livello di linfociti B, mentre la frequenza dei linfociti B CD27⁺ è risultata inferiore rispetto a quanto osservato nei soggetti sani.

In conclusione, la ridotta capacità maturativa delle cellule B in corso di infezione virale potrebbe essere uno dei difetti del sistema immunitario che contribuiscono all'instaurarsi della persistenza virale, quindi con potenziali riflessi sulla scarsa efficienza del sistema immune nella eliminazione virale. Inoltre, l'assenza di SCCA nei linfociti B potrebbe rappresentare un elemento nuovo nel fornire nuove ipotesi circa i difetti di funzione dei linfociti B nel LES. Nel complesso, i dati discussi nel presente lavoro suggeriscono un possibile coinvolgimento della serpina SCCA nelle deregolazione della reattività delle cellule B, tipicamente riscontrata nell'infezione da virus dell'epatite C e nei pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico.

Bibliografia

1. Alam R., Gorska M. Lymphocytes. *Journ Allergy and Clin Immun.* 2003; 111: 476 - 485.
2. Carding K. L., Egan P. J. Gammadelta T cells function: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2: 336 - 345.
3. Calame K. L. Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat Immunol.* 2001; 2: 1103 - 1108.
4. Walker L. S., Abbas A. K. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2: 11 - 19.
5. Shevach E. M., McHugh R. S., Piccirillo C. A., Thornton A. M. Control of T-cell activation by CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells. *Immunol Rev.* 2001; 182: 58 - 67.
6. Nemazee D. Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 19 - 51.

-
7. Delves P., Martin S., Burton D., Roitt I. *Roitt's Essential Immunology*. Blackwell Publishing. 2003 (11th edition).
 8. Hesslein D. G., Schatz D. G. Factors and forces controlling V(D)J recombination. *Adv Immunol*. 2000; 18: 19 - 51.
 9. Hennecke J., Wiley D. C. T cell receptor-MHC interactions up close. *Cell*. 2001; 104: 1 - 4.
 10. Cambier J. C. Inhibitory receptors abound? *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 5993 - 5995.
 11. Chaplin D. Overview of the human immune responses. *Journ Allergy and Clin Immun*. 2005; 117: 430 - 435.
 12. Hesslein D. G., Schatz D. G. Factors and forces controlling V(D)J recombination. *Adv Immunol*. 2001; 18: 19 - 51.
 13. Gauld S. B., Dal Porto J. M., Cambier J. C. B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease. *Science*. 2002; 296: 1641 - 1642.

-
14. Applequist S. E., Wallin R. P., Ljunggren H. G. Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptative immune cell lines. *Int. Immunol.* 1998; 28: 4188 - 4197.
 15. Harris D. P., Haynes L., Sayles P.C., Duso D. K., Eaton S. M., Lepak N. M. *et al.*, *Nat Immunol.* 2000; 1: 475 - 482.
 16. Viau M., Zouali M. B-lymphocytes, innate immunity and autoimmunity. *Clin Immunol.* 2005; 114: 17 - 26.
 17. Dustin M. L., Dustin L. B. The immunological relay race: B cells take antigen by synapse. *Nat Immunol.* 2001; 2: 480 - 482.
 18. Mohan C., Morel L., Yang P., Wakeland E. K. Accumulation of splenic B-1a cell with potent antigen-presenting capability NZM2410 lupus-prone mice. *Arthritis Rheum.* 1998; 41: 1652 - 1662.
 19. Schultz K. R., Klarnet J. P., Gieni R. S., HayGlass K. T., Greenberg P. D. *Science.* 1990; 249: 921 - 923.
 20. Cerny A., Zinkornagel R. M., Groscurth P. Development of follicular dendritic cells in lymph nodes of B-cell depleted mice. *Cell Tissue Rev.* 1998; 254: 449 - 454.

-
21. Lloyd A. R., Jagger E., Post J. J., Crooks L., Rawlison W. D., Hahn Y. S., French R. Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C infection. *Immunol and Cell Biol.* 2007; 85: 24 - 32.
22. Rehermann B., Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5: 215 - 229.
23. Blight K., Rowland R., Hall P. D., Lesniewski R. R., Trowbridge R., LaBrooy J. T, Gowans E. J. Immunohistochemical detection of the NS4 antigen of hepatitis C virus and its relation to histopathology. *Am J Pathol.* 1993; 143: 1568 - 1573.
24. Alberti A., L. Chemello, L. Benvegnù. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol.* 1999; 31: 17 - 24.
25. Bertoletti A., C. Ferrari. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology.* 2003; 38: 4 - 13.
26. Szabo G., Dolganiuc A. HCV immunopathogenesis: virus-induced strategies against host immunity. *Clin Liver Dis.* 2006; 753 - 771.
27. Kanto T., N. Hayashi. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern. Med.* 2006; 45: 183 - 191.

-
28. Barrett S., M. Sweeney, J. Crowe. Host immune responses in hepatitis C virus clearance. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 1089 - 1097.
29. Spengler U., J. Nattermann. Immunopathogenesis in hepatitis C virus cirrhosis. *Clin Science*. 2007; 112: 141 - 155.
30. Thimme R., K. M. Oldach, K. M.Chang, C. Steiger, S. C. Ray, F. V. Chisari. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001; 194: 1395 - 1406.
31. Neumann-Haefelin C., H. E. Blum, F. V. Chisari, R. Thimme. T cell response in hepatitis C virus infection. *J Clin Virol*. 2005; 32: 75 - 85.
32. Cerino A., L. Timo, G. Comolli, R. Cividini, R. Gulminetti, V. Barnaba, M. U. Mondelli. A.I.S.F. Annual Meeting. B lymphocytes activation in chronic HCV infection: possible implications for autoimmune and lymphoproliferative disorders [abstract]. *Dig. and Liv. Dis*. 2006; 38: A53 - A54.
33. Mondelli M. U., Zorzoli I., Cerino A., Cividini A., Bissolati M., segagni L., Perfetti V., Anesi F., Garini P., Merlini G. P. Clonality and specificity of cryoglobulins associated with HCV: pathophysiological implications. *J Hepat*. 1998; 29: 879 - 886.

-
34. Mondelli M. U. Multifaceted functions of B cells in chronic hepatitis C virus infection. *Antiv Research*. 2003; 60: 111 - 115.
35. Li C., Candotti D., Allain J. P. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for a conserved epitope within hepatitis c virus hypervariable region 1. *J Virol*. 2001; 75: 12412 - 12420.
36. Selva-O'Callaghan A., Rodriguez-Pardo D., Sanchez-Sitjes L., Matas-Percas L., Solans-Laque R., Bosch-Gil J. A., Vilardell-Tarres M. Hepatitis C virus infection, Sjögren's syndrome and non-Hodgkin's lymphoma. *Arthritis Rheum*. 1999; 42: 2489 - 2490.
37. Quinn F. R., Chan C. H., Hadlock K. G., Fong S. K., Flint M., Levy S. The B-cell receptor of a hepatitis C virus (HCV)-associated non-Hodgkin lymphomagenesis. *Blood*. 2001; 98: 3745 - 3749.
38. Zucca E., Bertoni F., Roggero F., Cavalli F. The gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type. *Blood*. 96: 410 - 419.
39. Crotta S., Stilla A., Wack A., D'Andrea A., Nuti S., D'Oro U., Mosca M., Filipponi F., Brunetto R. M., Bonino F., Abrignani S., Valiante N. M. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med*. 2002; 195: 35 - 41.

-
40. Tseng C. T. K., Klimpel G. R. Binding of the hepatitis c virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med.* 2001; 195: 43 - 50.
41. Mondelli M. U., Cerino A., Lisa A., Brambilla S., Segagni L., Cividini A., Bissolati M., Missale G., Bellati G., Meola A., Bruniercole B., Nicosia A., Galfrè G., Silini F. Antibody responses to hepatitis C virus hypervariable region 1: evidence for cross-reactivity and immune-mediated sequence variation. *Hepatology.* 1999; 30: 537 - 545.
42. Chang K. M., rehermann B., McHutchison J. G., Pasquinelli C., South-wood S., Sette A., Chisari F. V. Immunological significance of cytotoxic T lymphocyte epitope variants in patients chronically infected by hepatitis C virus. *J Clin Invest.* 1997; 100: 2376 - 2385.
43. Yao Z. Q., Nguyen D. T., Hiotellis A. I., Hahn Y. S. Hepatitis C virus core protein inhibits human T lymphocytes responses by a complement-dependent regulatory pathway. *J Immunol.* 2001; 167: 5264 - 5272.
44. Waggoner S. N., Hall C. H., Hahn Y. S. HCV core protein interaction with gC1q receptor inhibits Th1 differentiation of CD4+ T cells via suppression of dendritic cell IL-12 production. *J Leuko Biol.* 2007; 82: 1407 - 1419.

-
45. Ruiz-Irastorza G., Khmamashta A., Castellino G., Hughes G. R. V. Systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 2001; 357: 1027 - 1032.
46. Porakishvili N., Mageed R., Jamin C., Pers J.-O., Kulikova N., Renaudineau Y., Lydyard P. M., Youinou P. Recent progress in the understanding of B-cell functions in autoimmunity. *Scand J Immunol*. 2001; 54: 30 - 8.
47. Renaudineau Y., Pers J. O., bendaoud B., Jamin C., Youinou P. Dysfunctional B cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimm Rev*. 2004; 3: 516 - 523.
48. Katagiri C., Nakanishi J., Kadoya K., Hibino T. Serpin squamous cell carcinoma antigen inhibits UV-induced apoptosis via suppression of c-JUN NH2-terminal kinase. *J Cell Biol*. 2006; 172: 983 - 990.
49. Gettins P. G. W. Keeping the Serpin Machine Running Smoothly. *Genome Research*. 2000; 10: 1833 - 1835.
50. Takeda A., Kajiya A., Iwasawa A., Nakamura Y., Hibino T. Aberrant expression of serpin squamous cell carcinoma antigen 2 in human tumor tissues and cell lines: evidence of protection from tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *Biol Chem*. 2002; 383: 1231 - 1236.

-
- 51.** Suminami Y., Nagashima S., Murakami A., Nawata S., Gondo T., Hirakawa H., Numa F., Silverman G. A., Kato H. Suppression of a squamous cell carcinoma (SCC)-related serpin, SCC antigen, inhibits tumor growth with increased intratumor infiltration of natural killer cells. *Cancer Res.* 2001; 61: 1776 - 1780
- 52.** Janciauskiene S. Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2001; 1535: 221 - 235.
- 53.** Kato H., Torigoe T. Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer.* 1977; 40: 1621 - 1628.
- 54.** Cataltepe S., Gornstein E. R., Schick C., Kamachi Y., Chatson K., Fries J., Silverman G. A., Upton M. P. Co-expression of the squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in normal adult human tissues and squamous cell carcinomas. *Histochem Cytochem.* 2000 ; 48: 113 - 122.
- 55.** Senekjian E. K., Young J. M., Weiser P. A., Spencer C. E., Magic S. E., Herbst A. L., An evaluation of squamous cell carcinoma antigen in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Am J Obst Gin.* 1987; 157: 433 - 439.

-
- 56.** Esajas M. D., Duk J. M., de Bruijn H. W., Aalders J. G., Willemse P. H., Sluiter W., Pras B., ten Hoor K., Hollema H., van der Zee A. G. Clinical value of routine serum squamous cell carcinoma antigen in follow-up of patients with early-stage cervical cancer. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 3960 - 3966.
- 57.** Suminami Y., Nagashima S., Vujanovic N.L., Hirabayashi K., Kato H., Whiteside T.L. Inhibition of apoptosis in human tumor cells by the tumor-associated serpin, SCC antigen-1. *Brit J Cancer.* 2000; 82: 981 - 989.
- 58.** De Falco S., Ruvoletto M. G., Verdoliva A., Ruvo M., Raucci A., Marino M., Senatore S., Cassani G., Alberti A., Pontiso P., Fassina G. Cloning and expression of a novel hepatitis B virus binding protein from HepG 2 cells. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 36613 - 36623.
- 59.** Pontisso P., Poon M. C., Tiollais P., Brechot C. Detection of hepatitis B virus DNA in mononuclear blood cells. *Br Med J* 1984; 288: 1563 - 1536.
- 60.** Pontisso P., Morsica G., Ruvoletto M.G., Zambello R., Colletta C., Chemello L., Alberti A. Hepatitis B virus binds to peripheral blood mononuclear cells via the pre S1 protein. *J Hepatol.* 1991; 12: 203 - 206.

61. Uemura Y., Pak S. C., Luke C., Cataltepe S., Tsu C., Schick C., Kamachi Y., Pomeroy S. L., Perlmutter D. H., Silverman G. A. Circulating serpin tumor markers SCCA and SCCA2 are not actively secreted but reside in the cytosol of squamous carcinoma cells. *Int. J. Cancer.* 2000; 89:368 - 377.

62. Ruvoletto M. G., N. Tono, D. Carollo, T. Vilei, L. Trentin, M. Muraca, M. Marino, A. Gatta, G. Fassina, P. Pontisso. Surface expression of squamous cell carcinoma antigen (SCCA) can be increased by the preS1(21-47) sequence of hepatitis B virus. *J. Gen. Virol.* 2004; 85: 621 - 624.

63. Pontisso P., F. Calabrese, L. Benvegnù, M. Lise, C. Belluco, M. G. Ruvoletto, M. Marino, M. Valente, D. Nitti, A. Gatta, G. Fassina. Overexpression of squamous cell carcinoma antigen variants in hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer.* 2004; 90: 833 - 837.

64. Beneduce L., Castaldi F., Marino M., Tono N., Gatta A., Pontisso P., Fassina G. Improvement of liver cancer detection with simultaneous assessment of circulating levels of free alpha-fetoprotein (AFP) and AFP-IgM complexes. *Int J Biol Markers.* 2004; 19: 155 - 159.

-
- 65.** Yasumatsu R., T. Nakashima, K. Azuma, N. Hirakawa, Y. Kuratomi, K. Tomita, S. Caltalpe, G. A. Silverman, G. L. Clayman, S. Komyiama. SCCA1 expression in T-lymphocytes peripheral to cancer cells is associated with the elevation of serum SCC antigen in squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer Lett.* 2001; 167: 205 - 213.
- 66.** Molina R., Filella X., Torres M.D., Ballesta A. M., Mengual P., Cases A., Balaque A. SCC antigen measured in malignant and nonmalignant diseases. *Clin Chem* 1990; 36: 251 - 254.
- 67.** Takeshima N., Y. Suminami, O. Takeda, H. Abe, N. Okuno, H. Kato. Expression of mRNA of SCC antigen in squamous cells. *Tumour Biol.* 1992; 13:338 - 342.
- 68.** Kato H., Suehiro Y., Morioka H., Torigoe T., Myoga A., Sekiguchi K., Ikeda I. Heterogeneous distribution of acidic TA-4 in cervical squamous cell carcinoma: immunohistochemical demonstration with monoclonal antibodies. *Jpn J Cancer Res.* 1987; 78: 1246 - 1250.
- 69.** Kato H., Nagaya T., Torigoe T. Eterogeneity of a tumor antigen TA-4 of squamous cell carcinoma in relation to its appearance in the circulation. *GANN.* 1984; 75: 433 - 435.

-
- 70.** Kato H. Expression and function of squamous cell carcinoma antigen. *Anticancer Res.* 1996; 16: 2149 - 2153.
- 71.** Kato H. Squamous cell carcinoma antigen Serological Cancer Markers, Humana Press. 1992; 437 - 451.
- 72.** Hamada K., Shinomiya H., Asano Y., Kihana T., Iwamoto M., Hanakawa Y., Hashimoto K., Hirose S., Kyo S., Ito M. Molecular cloning of human squamous cell carcinoma antigen 1 gen and characterization of its promoter. *Biochim et Bioph Acta.* 2001; 1518: 124 - 131.
- 73.** Numa F., Takeda O., Nakata M., Nawata S., Tsugana N., Hirabayashi K., Suminami Y., Kato H., Hamanaka S. Tumor necrosis factor- α stimulates the production of squamous cell carcinoma antigen in normal squamous cells. *Tum Biol.* 1996; 17: 97 - 101.
- 74.** Tsuyama S., Hashimoto K., Nakamura K., Tamura H., Sasaki K., Kato H. Different behaviours in the production and release of SCC antigen in squamous-cell carcinoma. *Tum Biol.* 1991; 12: 28 - 34.
- 75.** Suminami Y., Kishi F., Sakaguchi K., Kato H. Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. *Bioch Bioph Res Commun.* 1991; 81: 51 - 58.

-
- 76.** Gettins P. G. Serpin structure, mechanism and function. *Chem. Rev.* 2002; 102: 4751 - 4804.
- 77.** Kuwano A., Kodo I., Kishi F., Suminami Y., Kato H. Assignment of the squamous cell carcinoma antigen in locus SCCA to 18q21.3 by in situ hybridization. *Genomics.* 1995; 30: 626.
- 78.** Silverman G.A., Bartuski A., Cataltepe S., Gornstein E.R., Kamachi Y., Schick C., Uemura Y. SCCA1 and SCCA2 are proteinase inhibitors that map to the serpin cluster at 18q21.3. *Tum Biol.* 1998; 19: 480 - 487.
- 79.** Schneider S.S., Schick C., Fish K.E., Miller J.C., Pena S.D., Treter S.M., Hui G.A., Silverman G.A. A serine proteinase inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 3147 - 3151.
- 80.** Suminami Y., Shugo N., Kato H. Biological role of SCC antigen. *Tum Biol.* 1998; 19: 488 - 493.
- 81.** Stein P. E., Laslie A. G., Finch J. T., Turnell W. G., McLaghlin P. J., Carrell R. W. Crystal structure of ovoalbumin as a model for reactive centre of serpins. *Nature.* 1990; 347: 99 - 102.

-
- 82.** Schick C., Kamachi Y., Bartuski A. J., Cataltepe S., Schecher N. M., Pemberton P. A., Silverman G. A. Squamous cell carcinoma antigen: a novel serpin that inhibits the chymotrypsin-like proteinases cathepsin G and mast cell chynase. *Journ Biol Chem.* 1997; 272: 1849 -1855.
- 83.** Schick C., Pemberton P. A., Shi G. P., Kamachi Y., Cataltepe S., Bartuski A. J., Gornstein E. R., Bromme D., Chapman H. A., Silverman G. A. Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsin K, L and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry.* 1998; 37: 5258 - 5266.
- 84.** Suchiro Y., Jato H., Nagai M., Torigoe T. Flow citometric analysis of tumor antigen TA-4 in cervical cytologic speciemens. *Cancer.* 1986; 57: 1380 – 1384
- 85.** Duk J. M, Van Voorst Vader P. C., Ten Hoor K. A., Hollema H., Doeglas H. M. G., De Bruijin H. W. A. Elevated levels of squamous cell carcinoma antigen in patients with benign disease of the skin. *Cancer.* 1989; 64: 1652 - 1656.
- 86.** Tramonti G., Ferdeghini M., Donadio C., Norpoth M., Annichiarico C., Bianchi R., Bianchi C. Renal function and serum concentration of five tumor markers (TATI, SCC, CYFRA 21-1, TPA, and TPS) in patients without evidence of neoplasia. *Cancer Detect Prev.* 2000; 24: 86 - 90.

-
- 87.** Miret C., Font J., Molina R., Filella X., Vivancos J., Muñoz-Rodríguez F. J., Cervera R., Ballesta A. M., Ingelmo M. Lack of correlation between tumor markers (CA 125 and SCC) and systemic lupus erythematosus activity. *Anticancer Res.* 1998; 18: 1341 - 1344.
- 88.** Ni J., E. Hembrador, A. M. Di Bisceglie, I. M. Jacobson, A. H. Talal, D. Butera, C. M. Rice, T. J. Chambers, L. B. Dustin. Accumulation of B lymphocytes with a naive, resting phenotype in a subset of hepatitis C patients. *J Immunol.* 2003; 170: 3429 - 3439.
- 89.** Renaudineau Y., Pers J. O., Bendaoud B., Jamin C., Youinou P. Dysfunctional B cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimm Rev.* 2004; 3: 516 - 523.
- 90.** Koike K. Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22: S108 -11.
- 91.** Bertoletti A., Ferrari C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology.* 2003; 38: 4 - 13.

-
- 92.** Quarta S., L. Vidalino, M. G. Ruvoletto, M. Della Barbera, F. Calabrese, M. Valente, L. Beneduce, A. Gatta, G. Fassina, P. Pontisso. SCCA over-expression induces cell proliferation and down-regulation of the adhesion system. [abstract]. *J Clin. Virol.* 2006; 36: S193.
- 93.** Levels of soluble VCAM-1, soluble ICAM-1, and soluble E-selectin during disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus (SLE); a long term prospective study. *Clin Exp Immunol.* 1994; 97: 439 - 444.
- 94.** Xiaofang Y., Yue Z., Xialian X., Zhibin Y. Serum tumour markers in patients with chronic kidney disease. *Scand J Clin Lab Invest.* 2007; 67: 661 - 667.
- 95.** Tangye S. G. , Y. J. Liu, G. Aversa, J. H. Phillips, J. E. De Vries. Identification of functional splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J Exp Med* 1998; 188: 1691 - 1703.
- 96.** Racanelli V., M. A. Frassanito, P. Leone, M. Galiano, V. De Re, F. Silvestris, F. Dammacco. Antibody production and in vitro behaviour of CD27-defined C-cell subsets: persistent hepatitis C virus infection changes the rules. *J Virol.* 2006; 80: 3923 - 3934.

-
- 97.** Ni J., E. Hembrador, A. M. Di Bisceglie, I. M. Jacobson, A. H. Talal, D. Butera, C. M. Rice, T. J. Chambers, L. B. Dustin. Accumulation of B lymphocytes with a naive, resting phenotype in a subset of hepatitis C patients. *J Immunol.* 2003; 170: 3429 - 3439.
- 98.** Sato S., Fujimoto M., Hasegawa M., Takehara K. Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum.* 2004 50: 1918 - 1927.
- 99.** Anolik J., Sanz I. B cells in human and murine systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 2004; 16: 505 - 512.