

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



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

Relazione 1° anno

**VARIAZIONI DEL GENE DI PERFORINA IN
PAZIENTI CON
AUTOIMMUNITA'/LINFOPROLIFERAZIONE E
UNA DIFETTIVA FUNZIONALITA' DI FAS**

Candidato: Cappellano Giuseppe
Responsabile del progetto: Prof. Dianzani Umberto

INTRODUZIONE

Apoptosi Fas-mediata

Nel sistema immunitario, l'apoptosi è il meccanismo principale con cui i linfociti in maturazione negli organi linfoidi primari vengono sottoposti alla selezione negativa per eliminare cellule potenzialmente autoreattive. L'induzione di apoptosi è anche il meccanismo preferenziale che viene attivato dalle cellule citotossiche contro le cellule bersaglio.

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

Fas è una glicoproteina transmembrana di 48 kD, espressa dalla maggior parte dei tessuti ed in modo particolare nei linfociti attivati, e ha un ruolo importante nell'eliminazione dei linfociti T autoreattivi e nel mantenimento dell'omeostasi dei linfociti periferici (Nagata, 1997; Baker *et al.*, 1998).

L'interazione di Fas, assemblato in forma trimerica, con un trimero di FasL innesca una cascata di eventi molecolari che portano alla morte apoptotica della cellula (Siegel *et al.*, 2000). In particolare, Fas lega la molecola adattatrice FADD che, interagendo con pro-caspasi 8, porta alla formazione del cosiddetto *Death-Inducing Signaling Complex* (DISC) (Griffith *et al.*, 1995; Gomez-Angelats *et al.*, 2001; Medema *et al.*, 1997; Los *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 2001; Krueger *et al.*, 2001).

L'attivazione della caspasi-8 attiva a cascata la caspasi-10 e le caspasi "esecutrici" -3, -7, -6, che realizzano il programma apoptotico mediante scissione diretta di diverse proteine vitali per la cellula e mediante l'attivazione di processi trascrizionali all'interno del nucleo.

Il *citocromo c* è la molecola chiave della via intrinseca; esso viene rilasciato dal mitocondrio nel citoplasma in seguito alla depolarizzazione della membrana mitocondriale. Il *citocromo c* si lega successivamente alla molecola adattatrice Apaf-1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor-1*) (Green *et al.*, 1998; Bossy-Wetzler *et al.*, 1999; Kroemer *et al.*, 2000) che lega a sua volta la pro-caspasi 9, portando alla formazione di un complesso detto *apoptosoma* che provoca l'attivazione della caspasi 9 (Desagher *et al.*, 2001; De Maria *et al.*, 1997, 1998; Hu *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1997).

L'attivazione della caspasi 8 può indurre la via intrinseca attraverso la formazione del frammento proteolitico tBid, derivato da *BH3-interacting domain death agonist* (Bid), una molecola pro-apoptotica citosolica appartenente alla famiglia Bcl-2 (Li *et al.*, 1998).

Fas attiva una sfingomielinasi acida ed induce quindi la produzione di ceramide (De Maria *et al.*, 1997). Sia Bid sia ceramide determinano la depolarizzazione della membrana mitocondriale e quindi il rilascio di *citocromo c*, amplificando così l'apoptosi Fas-mediata (Luo, 1998).

Le caspasi sono proteasi cisteina-dipendenti che proteolizzano il loro substrato tagliando dopo uno specifico residuo di acido aspartico. Queste proteine risiedono nel citoplasma in forma inattiva e, dopo reclutamento mediato dal recettore, si attivano in seguito ad un taglio proteolitico. La cascata delle caspasi attiva numerosi effettori che alla fine conducono alla morte cellulare (Thornberry *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 1999; Slee *et al.*, 1999). Tutte le caspasi sono prodotte sotto forma di proenzimi inattivi, che vengono attivati mediante l'eliminazione proteolitica della subunità inibitoria: l'attivazione può essere autocatalitica o mediata da un'altra caspasi.

La morte cellulare programmata riveste una importanza chiave nella citotossicità cellulo-mediata. I linfociti citotossici (CTL) e le cellule NK, infatti, riconoscono il bersaglio e lo uccidono innescando l'apoptosi attraverso vari meccanismi (Shresta *et al.*, 1998).

La cellula citotossica degranula e libera *perforina* e *granzimi* nello spazio intercellulare che la separa dal bersaglio (Trapani *et al.*, 1999). Perforina è una molecola dotata di un notevole grado di omologia col fattore C9 del complemento. E' pertanto in grado di polimerizzare sulla membrana della cellula bersaglio producendo dei pori attraverso cui passano i granzimi, proteasi capaci di attivare le caspasi ed innescare la morte cellulare programmata del bersaglio (Blink *et al.*, 1999).

I CTL esprimono FasL che, legandosi a Fas espresso dalla cellula bersaglio, attiva la cascata delle caspasi che innesca l'apoptosi (Sharma *et al.*, 2000)

L'apoptosi ha lo scopo di impedire che la risposta immunitaria, dopo l'eliminazione dell'antigene, si indirizzi erroneamente contro molecole *self* simili alle molecole esogene bersaglio della risposta. Questo errore della risposta immunitaria è considerato uno dei meccanismi alla base dello sviluppo di malattie autoimmuni ed è detto "mimetismo molecolare" (Ricci-Vitiani *et al.*, 2000; Mountz *et al.*, 1995).

Aspetti generali dell'autoimmunità

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

autoimmunità. Negli anni '60 si riteneva che tutti i linfociti autoreattivi fossero eliminati durante la maturazione linfocitaria e che le malattie autoimmuni fossero l'inevitabile conseguenza di errori nel processo di delezione delle cellule autoreattive negli organi linfatici primari. A partire dalla fine degli anni '70 sono state ottenute numerose evidenze sperimentali in contrasto con questo modello. Infatti, linfociti autoreattivi maturi circolanti sono normalmente presenti nei soggetti sani normali.

Poiché la presenza di queste cellule non porta inevitabilmente allo sviluppo di manifestazioni autoimmuni, la loro attività deve essere regolata attraverso meccanismi tollerogenici attivi in periferia. L'alterazione di questi meccanismi può portare all'attivazione di cloni di linfociti autoreattivi e al conseguente sviluppo di reazioni umorali o cellulari contro antigeni self.

In molti casi i fattori scatenanti che determinano il passaggio da una potenziale autoreattività alla malattia autoimmune sono gli agenti infettivi, spesso di tipo virale. Le infezioni possono scatenare la malattia attraverso vari meccanismi:

- la presenza negli agenti infettivi di antigeni simili ad antigeni self (fenomeno del "mimetismo molecolare"), può determinare una "cross-reazione" contro il self da parte della risposta anti-agente infettivo dopo che quest'ultimo è stato eliminato.

- l'infezione può danneggiare i tessuti causando la liberazione di antigeni normalmente sequestrati, che non sono mai stati visti dal sistema immunitario e che sono quindi erroneamente riconosciuti come non self.

- infine il processo infiammatorio cronico locale innescato dall'infezione nel tessuto, determina produzione di citochine e l'attivazione delle APC aumentandone la capacità di presentare gli antigeni e le capacità costimolatorie; la presenza di questo ambiente ipereattivo potrà permettere l'attivazione di linfociti T autoreattivi che non si sarebbero mai attivati in un contesto immunologicamente a riposo.

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

Le malattie autoimmuni possono essere divise in due grandi categorie: quelle organo-specifiche e quelle sistemiche. Nelle malattie autoimmuni organo-specifiche, la risposta immunitaria è diretta contro un antigene bersaglio espresso selettivamente da un certo organo, per cui le manifestazioni della malattia sono in gran parte limitate ad esso. Nelle malattie autoimmuni

sistemiche la risposta è diretta contro antigeni bersaglio espressi ubiquitariamente in numerosi tessuti e coinvolge quindi più organi e tessuti.

Dal punto di vista del meccanismo immunopatogenetico, le malattie autoimmuni possono essere mediate da anticorpi oppure da cellule. Le prime comprendono malattie come le emocitopenie autoimmuni, causate da autoanticorpi contro vari tipi di cellule del sangue, oppure il lupus eritematoso sistemico, causato dalla deposizione in vari tessuti di immunocomplessi formati principalmente da anticorpi contro complessi DNA-istoni o RNA-ribonucleoproteine e i rispettivi autoantigeni. Fanno parte di questa categoria anche alcune malattie autoimmuni organo-specifiche causate da autoanticorpi capaci di esercitare un'attività agonista o antagonista sull'organo bersaglio; ad esempio nel morbo di Graves-Basedow anticorpi anti-recettore del TSH causano iperfunzione tiroidea, mentre nella miastenia grave anticorpi contro il recettore dell'acetilcolina inibiscono la trasmissione dell'impulso neuromuscolare. Le malattie autoimmuni cellulo-mediate sono una categoria in continua crescita e sono mediate principalmente da linfociti T helper di tipo 1 (Th1), caratterizzati dalla produzione delle citochine proinfiammatorie IL-2, IFN γ e Linfotossina, e da linfociti T citotossici (Tc). Esempi di questo tipo di malattie autoimmuni sono il diabete mellito di tipo 1 oppure la sclerosi multipla in cui i linfociti Th1 e Tc aggrediscono rispettivamente le cellule β del pancreas e la mielina del sistema nervoso centrale. In queste malattie si osserva spesso anche la produzione di autoanticorpi, che sono considerati utili marcatori dello sviluppo della malattia, ma questi sarebbero conseguenza del fenomeno dell'epitope spreading e avrebbero un modesto ruolo patogenetico.

Molte malattie autoimmuni presentano un certo grado di familiarità. Questo ha indotto lo svolgimento di una enorme mole di studi volti a definire i fattori genetici coinvolti nel loro sviluppo. Nel loro complesso i dati ottenuti disegnano il quadro tipico delle malattie multifattoriali in cui un insieme di geni diversi possono influire nella suscettibilità genetica allo sviluppo della malattia, che richiede comunque l'induzione da parte di fattori scatenanti. Molti studi genetici hanno evidenziato l'associazione statistica di malattie autoimmuni con particolari polimorfismi di specifici geni, ovvero è stato dimostrato che una certa malattia autoimmune è più frequente nei portatori di un determinato allele di un certo gene. Tuttavia spesso non è chiaro se questi geni siano coinvolti direttamente nello sviluppo della malattia oppure se l'associazione statistica sia legata a fenomeni di linkage disequilibrium, ovvero al fatto che un allele si associa frequentemente ad un particolare allele di un altro gene non noto, posto per lo più in vicinanza al primo e coinvolto nella genesi della malattia.

Nel complesso, i fattori genetici che sono stati associati con maggiore certezza all'autoimmunità e la cui base biologica sia stata dimostrata in modo soddisfacente sono il sesso e

l'aplotipo HLA. A questi si sono più recentemente affiancati fattori genetici in grado di controllare lo spegnimento della risposta immunitaria. Infatti, per la maggior parte di queste malattie è stata descritta l'associazione con determinati alleli HLA. L'associazione è in genere con alleli di molecole HLA di classe II, anche se in alcuni casi è stata descritta l'associazione con molecole di classe I. Ad esempio, il rischio di sviluppo di diabete mellito insulino-dipendente è circa 20 volte maggiore in soggetti che esprimono HLA-DR3 e DR4, rispetto a soggetti che esprimono altri alleli; la probabilità di sviluppare sclerosi multipla è 5 volte maggiore nei portatori di DR2; quella di sviluppare miastenia grave è 5 volte maggiore nei portatori di DR3. L'associazione più stretta è però stata osservata nella spondilite anchilosante, il cui rischio di sviluppo è 90 volte superiore in soggetti portatori della molecola di classe I HLA-B27. In molti casi è stato dimostrato che questa associazione può essere dovuta all'efficienza con cui le molecole predisponenti "presentano" i peptidi self responsabili di quella malattia autoimmune. E' intuitivo infatti che gli individui che esprimono molecole HLA capaci di presentare efficientemente i peptidi self verso cui si sviluppa una certa risposta autoimmune siano più predisposti allo sviluppo della malattia rispetto a soggetti che esprimono molecole MHC poco efficienti nella presentazione degli stessi.

Autoimmunità e Fas: la Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS)

Un fattore genetico ereditario che è stato chiamato in causa come responsabile nello sviluppo dell'autoimmunità è il difetto funzionale del sistema Fas/FasL (Rieux-Leucat *et al.*,1995; Dianzani *et al.*,1997).

La prima associazione tra il sistema Fas e l'autoimmunità è stata per la prima volta osservata in topi omozigoti per i caratteri *lpr* (lymphoproliferation) e *gld* (generalized lymphoproliferative disease) portatori rispettivamente di mutazioni nel gene di Fas e FasL, i quali sviluppano un quadro autoimmune/linfoproliferativo con linfadenopatia, splenomegalia e autoimmunità a carattere sistemico, prevalentemente rivolte verso cellule del sangue. In più essi evidenziano una periferica espansione di cellule linfocitarie che mancano sia di CD4, molecola marcatrice delle popolazioni T helper, che di CD8, marcatore delle T citotossiche, e definite per questo cellule doppie negative (DN). L'associazione di questi caratteri con un mancato funzionamento del sistema Fas e' stato successivamente confermato dallo sviluppo di sintomi simili manifestati da topi knock-out per il gene codificante per Fas.

Alterazioni genetiche del sistema Fas/FasL determinano la comparsa, nell'uomo, di una patologia nota come Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa, originariamente nota come

Sindrome di Canale-Smith. Sebbene identificata definitivamente nel 1995, già dal 1990 venivano descritti bambini con disordini di tipo immunitario che non si richiamavano a nessuna patologia fino ad allora nota. ALPS è una malattia con insorgenza pediatrica i cui sintomi diagnostici sono riconducibili a:

- 1) ridotta funzionalità di Fas;
- 2) sviluppo di manifestazioni autoimmuni con associazioni variabili di anemia, trombocitopenia, neutropenia e vasculite;
- 3) accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari, con linfadenopatie e/o splenomegalia;
- 4) eventuale espansione di linfociti T DN nel sangue periferico.

Come nel modello murino, anche nei pazienti con ALPS la funzionalità di Fas è ridotta a causa di mutazioni inattivanti ereditarie a carico di geni coinvolti in questo sistema. Nei pazienti con ALPS di tipo Ia (ALPS-Ia) il difetto genetico è a carico del gene codificante per Fas (Choi *et al.*, 1999); nei pazienti con ALPS-Ib è mutato il gene di FasL (Wu JG *et al.*, 1996); nei pazienti con ALPS-II è mutato il gene di caspasi 10, coinvolta nella via di trasduzione del segnale di Fas (Wang *et al.*, 1999). Nei pazienti ALPS-III il difetto genetico non è ancora noto. Il nostro laboratorio ha identificato un gruppo di pazienti, che presentano tutte le condizioni dei pazienti ALPS tranne che l'espansione dei linfociti T doppi negativi. Inoltre questi pazienti non presentano mutazioni rispettivamente nei geni di Fas e FasL e caspasi 10; la maggior parte dei loro genitori sono resistenti all'apoptosi Fas-mediata. In questi pazienti la malattia è stata denominata DALD (Dianzani's Autoimmune LymphoProliferative Syndrome) (OMIM reference #605233; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>).

Il nostro laboratorio ha recentemente descritto alcuni alleli del gene della citochina osteopontina (OPN) capaci di favorire lo sviluppo della DALD. Questi alleli che costituiscono gli aplotipi 282C-750T-1083A-1239C e 282C-750T-1083G-1239C (denominati OPN^{high}) aumentano il rischio di 8 volte di sviluppare DALD ed inducono la produzione di elevate quantità di OPN, la quale favorisce la risposta infiammatoria (Chiocchetti *et al.*, 2004).

Sia nel topo che nell'uomo il quadro ALPS sembra essere oligogenico. Nel topo le mutazioni *lpr* e *gld* causano la malattia solo in omozigosi; inoltre la loro espressione dipende fortemente dal contesto genetico, dal momento che la malattia si sviluppa in forma grave nei topi MLR, mentre è blanda nei topi BALB/c (Nagata *et al.*, 1995). Altri fattori complementari sembrano quindi essere richiesti per lo sviluppo della malattia.

Nell'uomo la situazione è simile. Infatti nell'ALPS-Ia la maggior parte dei pazienti è eterozigote per la mutazione di Fas, ma questo non è sufficiente per lo sviluppo della malattia in

quanto il genitore che ha trasmesso la mutazione è in genere sano. La possibilità che il “secondo fattore” necessario per lo sviluppo di ALPS abbia basi genetiche è suggerita dal fatto che spesso il genitore, privo di mutazioni di Fas, presenta anch'esso una ridotta funzionalità del recettore. L'espressione della malattia quindi, potrebbe dipendere dal tipo e dalla gravità delle mutazioni e/o dalla co-presenza di più alterazioni geniche a carico della via di trasduzione di Fas (Jackson *et al.*, 1999).

Sebbene la linfoproliferazione sia generalmente benigna, l'incidenza di sviluppo di linfoma nei pazienti con ALPS è significativamente elevata. Uno studio su 130 pazienti con mutazioni in Fas, ha dimostrato che il rischio di sviluppare linfomi di Hodgkin è circa 50 volte superiore, mentre quello di sviluppare linfomi non Hodgkin è 14 volte superiore rispetto alla popolazione sana sotto i 65 anni di età (Straus *et al.*, 2001). Un deficit nell'apoptosi Fas-mediata può compromettere la capacità dell'organismo di proteggersi dalla trasformazione neoplastica dei linfociti, mediante il fallimento della sorveglianza immunitaria (Straus *et al.*, 2001; Muschen *et al.*, 2002; Davidson *et al.*, 1998). In questo contesto, potrebbe risultare critica l'integrità della via perforina-granzima.

Perforina: struttura e funzione.

Il gene umano di perforina, localizzato sul cromosoma 10q22 è costituito da tre esoni: il primo non tradotto e gli altri due codificanti per una proteina di 555 aminoacidi. Essa è suddivisa in diversi domini: 21aa formano la sequenza segnale, una regione di 300aa con una forte omologia con la proteina C9 del complemento, una regione di 36aa che forma un dominio EGF-like (Epidermal Growth Factor) e una regione di 132aa omologa al dominio C2 della protein-chinasi C (Lichtenheld *et al.*, 1988; Uellner *et al.*, 1997). Inoltre, la proteina contiene due siti di N-glicosilazione e viene sintetizzata come precursore inattivo che processato nel carbossiterminale, rilascia circa 20 aminoacidi e si trasforma in proteina attiva (Uellner *et al.*, 1997). In seguito alla sintesi nel reticolo endoplasmatico rugoso, le molecole di perforina si spostano attraverso i compartimenti del Golgi dove continua la modificazione post-traduzionale e vengono infine impaccate nei granuli litici dei CTL e delle cellule NK.

Il dominio C2 di perforina è molto importante per il legame della proteina al doppio strato fosfolipidico della cellula bersaglio. Nella forma immatura il dominio C2 non è in grado di legare la membrana a causa di residui di glicani legati al dominio carbossiterminale. Il taglio proteolitico di questo dominio, espone il dominio C2 che interagisce così con la cellula bersaglio.

Perforina è una proteina citosolica che è sintetizzata dai linfociti citotossici (CTL) e dalle cellule natural killer (NK) e successivamente viene sequestrata nei granuli citotossici. Dopo che si è

formata la sinapsi immunologica tra il linfocita citotossico (CTL e NK) e la cellula infettata dal virus o tumorale, i granuli citotossici si fondono con la membrana dei CTL e riversano il loro contenuto (che include anche i granzimi) nella sinapsi stessa.(Barry *et al.*, 2002;Trapani *et al.*, 2002; Trapani *et al.*, 2003). Perforina potrebbe perciò avere un ruolo nel rilascio dei granzimi dal compartimento endocitico della cellula bersaglio (Smyth *et al.*, 2005). I granzimi, in particolare i granzimi A e granzimi B, successivamente inducono l'apoptosi della cellula bersaglio in modo caspasi dipendente e caspasi indipendente.

Il meccanismo di sinergia tra perforina ed i granzimi non è stato completamente delucidato. Infatti le molecole di granzima possono entrare efficientemente e rapidamente nelle cellule per mezzo dell'endocitosi mediata da recettore (Trapani *et al.*, 2003). In particolare è stato dimostrato che il recettore del mannosio 6-fosfato (MPR) può agire come recettore per l'internalizzazione di Granzima B, tramite endocitosi mediata da recettore (Motyka *et al.*, 2000).

Le cellule NK e i CTL sono protetti dall'azione di perforina e granzimi in quanto, dopo l'esocitosi dei granuli, la catepsina B, una proteasi lisosomiale, viene espressa sulla superficie cellulare e inattiva le molecole di perforina che si legano alle cellule killer (Balaji *et al.*, 2002). Utilizzando infatti degli inibitori specifici di catepsina B, si assiste al suicidio perforina-dipendente degli stessi CTL e delle cellule NK dopo la degranolazione.

Il ruolo importante di perforina nel mantenimento dell'omeostasi e della sorveglianza immunitaria è stato delucidato grazie alla generazione di topi *knockout*. Questi topi hanno livelli normali di cellule NK e linfociti T CD8+ e, in assenza di infezioni, sono sani (Kagi *et al.*, 1994). In caso di infezione, batterica e/o virale, questi animali sviluppano una risposta infiammatoria esagerata, che rappresenta la vera causa di morte. Questi animali sviluppano linfoistocitosi emofagocitica con febbre, splenomegalia, emofagocitosi, ipertrigliceridemia e ipofibrinogenemia (Jordan *et al.*, 2004). I linfonodi e la milza mostrano deplezione dei follicoli secondari. Infiltrati periportalari sono presenti nel fegato e il midollo osseo mostra ipoplasia. I topi hanno elevati livelli di IL-6, IL-10, IL-18, M-CSF, INF- α , INF- γ e TNF- α , e anticorpi diretti verso INF- γ prolungano la sopravvivenza e prevengono lo sviluppo di infiltrati istiocitici e il quadro citopenico.

La caratterizzazione della linfoistocitosi emofagocitica nei topi perforina-deficienti ha permesso a questi studiosi di creare un modello per spiegarne la patogenesi (Jordan *et al.*, 2004).

I linfociti T, stimolati dalle APC, producono una varietà di citochine, tra cui l'INF- γ , ed iniziano ad uccidere le cellule infettate, tra cui le APC e i macrofagi, attraverso la via di perforina, che però, in questi animali, risulta alterata. L'alterazione della citotossicità dei linfociti T CD8+ comporta la persistenza di cellule infettate dal patogeno e quindi la continua esposizione degli antigeni da parte

delle APC con conseguente proliferazione degli stessi linfociti T e dei macrofagi (Arnaout, 2000; Moretta *et al.*, 2000).

Lo sviluppo di topi *knockout* per perforina ha permesso di sottolineare il ruolo critico anche nella soppressione dei tumori. Questi modelli animali sono più suscettibili alla tumorigenesi e per questo sviluppano spontaneamente linfomi in età adulta. Perforina sembra contribuire alla soppressione del linfoma quando viene compromessa l'espressione di p53 (Smyth *et al.*, 2000; Trapani *et al.*, 2002).

Nell'uomo il deficit di perforina nell'uomo è associato ad una sindrome nota come linfoistiocitosi emofagocitica familiare (FHL).

La FHL è la forma primaria della sindrome emofagocitica (HPS) caratterizzata da febbre alta, epatosplenomegalia, citopenia, alti livelli di ferritina, aumentata proliferazione e attivazione di macrofagi con emofagocitosi attraverso il sistema reticoloendoteliale.

Le manifestazioni cliniche e biologiche dipendono da un'incontrollata attivazione di linfociti T, che promuovono la conseguente attivazione di macrofagi e la produzione di citochine. Nei pazienti con HPS in fase attiva, i livelli serici di citochine Th1, tra cui IFN- γ , IL-12 e IL-18 (Osugi Y *et al.*, 1997; Hasegawa *et al.*, 1998; Takada *et al.*, 2001), sono significativamente più elevati rispetto ai pazienti in remissione o ai controlli sani. IL-18 sembra giocare un ruolo importante nell'induzione della secrezione di IFN- γ e IL-12, i cui livelli correlano positivamente con il progredire della malattia (Takada *et al.*, 2001). Anche i livelli di citochine pro-infiammatorie, TNF α , IL-1 β e IL-6, risultano essere elevati nei pazienti con HPS rispetto ai controlli, mentre non c'è alcuna differenza nella secrezione di IL-4 (Henter *et al.*, 1991; Akashi *et al.*, 1994, Ishii *et al.*, 1991).

La FHL è una malattia autosomica recessiva che colpisce circa 1/50000 nati. E' una patologia caratterizzata da massiva attivazione macrofagica (definita anche linfoistiocitosi), che insorge di solito dopo un periodo di buona salute e che dura da alcuni mesi ad alcuni anni dopo la nascita (Arico *et al.*, 1996; Clementi *et al.*, 2002). La sindrome è di solito scatenata da un'infezione virale. Nella maggior parte dei casi, i primi segni comprendono febbre elevata senza causa apparente, irritabilità, malessere generale, edema ed epatosplenomegalia. Dal punto di vista biologico possono comparire pancitopenia associata a citolisi epatica, ipertrigliceridemia, fibrinopenia, emodiluizione, alterazioni neurologiche, mentre gli organi viscerali e linfatici sono infiltrati da linfociti e macrofagi attivati che fagocitano i globuli rossi. L'emofagocitosi è infatti un elemento caratteristico di questa malattia. Il midollo osseo è il sito più comune della emofagocitosi, sebbene ne siano affetti frequentemente anche milza, fegato e linfonodi. Quando l'emofagocitosi è

prominente nel midollo osseo, si ha una diminuzione di precursori normali a cui si associa pancitopenia.

L'attività citotossica dei CTL e delle cellule NK è severamente ridotta. Si assiste a risposte immunitarie incontrollate che comportano infiltrazione e distruzione di tessuti ad opera dei macrofagi attivati (CD68+), e dei CTL CD8+. Queste cellule sono spesso presenti nel midollo osseo, nella milza, nei linfonodi, nel fegato e nel sistema nervoso centrale. Anche altri organi possono essere infiltrati da queste cellule: i polmoni, il cuore, l'intestino, il timo, i reni e il pancreas. L'attivazione incontrollata dei macrofagi e dei linfociti T comporta il rilascio di citochine pro-infiammatorie che contribuiscono alla emofagocitosi, all'infiltrazione cellulare e al danno d'organo. Il livello di caspasi spontaneamente attivate nei linfociti di pazienti FHL è ridotto, e questo può contribuire a spiegare l'elevato numero di linfociti T attivati (Fadeel *et al.*, 1999).

Diversi studi hanno dimostrato che FHL è legata a tre loci genici: 9q21-22 [FHL1] (Ohadi *et al.*, 1999), 10q21 [FHL2] e 17q25 [FHL3]. Mentre il gene candidato della FHL1 è ancora sconosciuto, mutazioni in perforina sono responsabili della FHL2 (Stepp *et al.*, 1999) e mutazioni in Munc 13-4 portano a FHL3 (Feldmann *et al.*, 2003).

Le mutazioni note in perforina associate alla FHL sono mutazioni bialleliche che determinano una bassa espressione o una totale assenza della proteina nelle cellule citotossiche. La riduzione dell'attività di perforina nei pazienti con FHL può anche essere il risultato di una sua instabilità, di un problema di traffico intracellulare o della sua incapacità di legare i bersagli.

I genitori dei pazienti mutati in perforina, che sono portatori asintomatici ed eterozigoti per la mutazione, hanno spesso ridotti livelli di perforina nelle cellule NK e nei CTL (Kogawa *et al.*, 2002) e in alcuni casi mostrano una ridotta attività litica delle NK.

Nei pazienti FHL sono state individuate una varietà di mutazioni lungo tutta la sequenza codificante per perforina, mutazioni che includono codoni di stop, delezioni e sostituzioni aminoacidiche (Stepp *et al.*, 1999; Busiello *et al.*, 2004; Molleran Lee *et al.*, 2004; Voskoboinik *et al.*, 2004). Alcune mutazioni in perforina sembrano prerogativa di una data etnia che suggerisce la presenza di un allele ancestrale comune.

Infine, mutazioni nella sequenza codificante di perforina sono responsabili di circa il 60% dei casi di FHL nelle popolazioni giapponese, europea e orientale (Goransdotter Ericson *et al.*, 2001; Suga *et al.*, 2002) e di quasi il 58% nella popolazione nord-americana (Molleran Lee *et al.*, 2004). Nel gene di perforina, inoltre, sono stati identificati otto polimorfismi con frequenze alleliche comprese tra 0.5% e 67% (Molleran Lee *et al.*, 2004). Tre di questi portano ad una sostituzione aminoacidica: A91V, R123H e N252S e sono stati variabilmente associati alla malattia (Stepp *et al.*, 1999; Clementi *et al.*, 2002; Feldmann *et al.*, 2002).

SCOPO DEL LAVORO

La sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS) è una malattia oligogenica. Alla base vi è il deficit funzionale della via di trasduzione Fas-mediata e tra i fattori genetici che concorrono allo sviluppo della malattia, vi sono mutazioni nei geni che codificano per Fas (ALPS Ia), FasL (ALPS Ib) e caspasi 10 (ALPS II). Le mutazioni note sono presenti, in genere, in eterozigosi, vengono ereditate da un genitore sano e pertanto non sono in grado da sole di portare allo stato conclamato della sindrome. Il concorso di mutazioni in altri geni è suggerito dal fatto che il genitore privo della mutazione presenta anch'esso un difetto nell'apoptosi mediata da Fas.

Rimane tuttavia un grande gruppo di casi (ALPS III), in cui le alterazioni geniche coinvolte non sono ancora state identificate. In questo ambito, il nostro laboratorio ha individuato una sindrome ALPS-simile, definita DALD (Dianzani's Autoimmune lymphoproliferative disease) che, pur manifestando sintomi diagnostici identici all'ALPS, manca dell'espansione periferica dei linfociti T doppi negativi (DN).

Nel nostro laboratorio è stata recentemente descritta in un paziente ALPS Ia una mutazione in eterozigosi a carico del gene di perforina; dal momento che le due mutazioni sono state ereditate distintamente da uno dei due genitori, entrambi sani, abbiamo suggerito che la loro co-trasmissione concorresse allo sviluppo dell'ALPS nel paziente.

Mutazioni bialleliche nel gene di perforina. causano la Linfocitocitosi Emofagocitica Familiare (FHL); inoltre, sia i pazienti affetti da FHL che quelli affetti da ALPS mostrano caratteristiche comuni, presentano infatti un quadro di linfoproliferazione e hanno una maggior suscettibilità allo sviluppo di linfomi di varia natura.

Le somiglianze tra le due malattie, insieme all'osservazione che Fas e Perforina possono essere coinvolte sia nella citotossicità cellulo-mediata, sia in processi di immunosorveglianza, ci hanno indotto a valutare se variazioni monoalleliche in perforina, insufficienti ad indurre lo sviluppo di FHL, potessero funzionare da fattore predisponente allo sviluppo di ALPS/DALD quando associate a difetti ereditari della funzione di Fas.

Con queste premesse, questo lavoro estende l'analisi del gene di perforina in una casistica di pazienti molto più ampia e ne valuta il suo ruolo nello sviluppo dell'ALPS/DALD.

MATERIALI E METODI

Pazienti.

Nel nostro studio abbiamo analizzato 14 pazienti con ALPS e 28 pazienti con DALD seguiti dal Dipartimento di Pediatria dell'Università di Torino. La diagnosi di ALPS si è basata sui seguenti criteri:

- 1) citopenia di origine autoimmune che coinvolgesse una o più linee di cellule ematiche;
- 2) linfadenopatie croniche non maligne (aumento di almeno 2cm di diametro di due o più linfonodi) e/o splenomegalia;
- 3) difettiva apoptosi Fas-indotta in vitro;
- 4) mutazioni nei geni Fas, FasL, caspasi 10 e/o espansione dei linfociti T doppi negativi nel sangue periferico.

I geni di Fas, FasL e caspasi-10 ed osteopontina sono stati sequenziati da DNA genomico per investigare se non ci fossero mutazioni. Sette pazienti ALPS sono portatori della mutazione in eterozigosi del gene Fas.

La diagnosi della DALD si è basata sulla presenza solo dei primi 3 criteri. Due pazienti DALD (DALD-2 e DALD-24) sono portatori di una variazione in eterozigosi del gene di caspasi 10 (V410I), inizialmente associata all'ALPS, ma poi riconosciuta come polimorfismo. Nessun paziente soddisfaceva i criteri diagnostici per FHL (storia familiare della malattia positiva, febbre, ipertrigliceridemia e/o ipofibrinogenemia e emofagocitosi nella milza, nel midollo osseo e nei linfonodi).

Sono stati analizzati 816 controlli sani, etnicamente correlati, provenienti dal Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università del Piemonte Orientale, dal reparto di Pediatria dell'Ospedale Maggiore di Novara e da Milano. I prelievi di sangue periferico sono stati ottenuti da pazienti e controlli sotto consenso informato. Lo studio è stato effettuato secondo le linee guida del comitato etico locale.

Separazione dei linfociti su gradiente di Ficoll.

I campioni di sangue eparinato, prelevato da pazienti o soggetti sani di controlli sono stati diluiti in rapporto 1:1 con PBS 1X. La separazione di cellule mononucleate di sangue periferico (PBMCs) è stata ottenuta tramite centrifugazione su gradiente di densità discontinuo utilizzando Ficoll (Hypaque). Le cellule ottenute sono state contate mediante l'utilizzo di una camera di Bürker, e messe in coltura, alla concentrazione di 5×10^5 cellule/mL, in terreno RPMI 1640 (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD) supplementato di siero fetale bovino (FBS - Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD) al 10% e di IL-2 (Sigma-Aldrich corporation, St Louis, Missouri), a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂.

Analisi immunofenotipica

L'espressione di molecole di superficie è stata valutata con immunofluorescenza diretta e analisi al citofluorimetro (FACScan, Becton-Dickinson, San Jose, CA). Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali (mAbs): anti-CD3 (Leu-4), anti-CD4 (Leu-3a), anti-CD8 (Leu-2a), anti-TCR $\alpha\beta$ (Becton-Dickinson), anti-Fas (Immunotech, Marseilles, France) anti-CD16 (Caltag), anti-CD56 (Caltag).

Le cellule CD4⁻ e CD8⁻ TCR $\alpha\beta$ ⁺ sono state visualizzate con immunofluorescenza a tre colori, utilizzando anticorpi mAb anti-TCR coniugato con FITC, mAbs anti-CD4 coniugato con PE e anti-CD8 coniugato con PerCP.

Le cellule NK (CD3-CD56⁺ e CD3-CD16⁺) sono state identificate con doppia immunofluorescenza, utilizzando anticorpi anti-CD3 coniugato FITC e anti-CD16 o anti-CD56 coniugati con PE.

Saggio di sopravvivenza cellulare.

La morte cellulare indotta dalla stimolazione di Fas è stata valutata su linee linfocitarie T ottenute da PBMCs attivati con 1 μ g/ml (t=0) e 0.1 μ g/ml (t=15) di PHA e coltivate in RPMI 1640 + 10% FBS + 2U/ml di rIL-2 (Biogen, Geneva, Switzerland). La funzione di Fas è stata valutata a 6 giorni dalla seconda stimolazione (t=21 di coltura).

Le cellule sono state incubate con terreno di controllo o con un terreno contenente un anticorpo monoclonale agonista anti-Fas (1 μ g/ml - CH11, isotipo IgM-UBI, Lake Placid, NY) in presenza di

rIL-2 (1U/ml) per minimizzare la morte cellulare spontanea e di 5% FBS per impedire la crescita cellulare durante l'incubazione. La sopravvivenza cellulare è stata valutata 18 ore dopo contando le cellule vive in ciascun pozzetto al microscopio ottico con camera di Bürker, in seguito a colorazione con Tripan Blue . Il test è stato eseguito in triplo e la vitalità analizzata in cieco.

Le cellule di due controlli sani sono state incluse in tutti i test come controlli positivi. I risultati sono stati espressi come sopravvivenza cellulare relativa percentuale, calcolati secondo la seguente formula: (cellule vive dopo stimolo apoptotico/cellule vive non trattate) x 100. Il limite superiore di normalità per la sopravvivenza cellulare in risposta ad anticorpi anti-Fas, è stato definito come media + 2 DEV.ST. dei dati ottenuti da 68 controlli sani; le risposte tra la media + 1 DEV.ST. e la media + 2 DEV.ST. sono state definite come "border-line".

Estrazione di DNA da sangue.

Ai campioni di sangue eparinato, prelevato da pazienti o soggetti sani di controlli, è stata aggiunta una soluzione fisiologica (NaCl 0.9%) in rapporto 2:1 con il sangue stesso. I campioni sono stati centrifugati a 2500 rpm per 20 min. Questo lavaggio è stato ripetuto due volte. E' stata quindi aggiunta una soluzione emolitica per 10-15 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati centrifugati a 2500 rpm per 20 min e per rimuovere eventuali residui derivati dall'emolisi è stato effettuato un ulteriore lavaggio con soluzione fisiologica, centrifugando 10 min a 1500 rpm.

Successivamente, sono stati aggiunti nel seguente ordine: *Lysis Buffer* (10 mM TRIS pH 8.2, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA), SDS 20% (25 µl per ogni ml di *Lysis Buffer*) e Proteinasi K (20 mg/ml: 25 µl per ogni ml di *Lysis Buffer*). I campioni sono stati successivamente incubati a 37°C, in agitazione, per 16 ore. Il "salting-out" delle proteine è stato ottenuto con l'aggiunta una soluzione NaCl 6M. Le proteine precipitate sono state rimosse mediante centrifugazione per 20 min a 2500 rpm.

Al surnatante è stato poi aggiunto etanolo assoluto in rapporto 1:1 vol/vol con il surnatante stesso per precipitare il DNA. La matassa di DNA formatasi è stata lavata con un volume di etanolo al 70% ed il DNA è stato infine risospeso in TE (10mM Tris-HCL pH 7,5 e 1mM EDTA pH 8).

PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

L'esone 2 e 3, codificanti il gene perforina, includendo anche le giunzioni esone-introne, sono stati amplificati da campioni di DNA genomico estratto da PBMC dei pazienti e controlli e usando i seguenti primers, per l'esone 2: 5'-CCCTTCCATGTGCCCTGATAATC-3' (*forward*) e 5-

AAGCAGCCTCCAAGTTTGATTG-3' (*reverse*) e per l'esone 3:
5'-CCAGTCCTAGTTCTGCCCACTTAC-3' (*forward*) e
5'-GAACCCCTTCAGTCCAAGCATAAC-3' (*reverse*). La reazione di PCR è stata allestita con 100-300 ng di DNA in volume finale di 50µl contenente il tampone di reazione (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0.5 µM di ciascun oligonucleotide, 0.2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi e 1U Taq DNA polimerasi (5U/µl) (Invitrogen). Le concentrazioni di MgCl₂ impiegate per l'amplificazione sono : 1mM (esone 2) e 2 mM (esone 3).

Le condizioni di reazione sono le seguenti:

Esone 2: 1 ciclo di denaturazione a 94° 5'; seguito da 35 cicli composti da una fase di denaturazione a 94°C per 30'', una di appaiamento a 65°C per 30'', e una di sintesi a 72°C per 1'. Segue infine un ciclo di sintesi a 72°C per 10'.

Esone 3: il programma è sovrapponibile a quello utilizzato per l'esone 2 con l'unica differenza che la fase di sintesi a 72°C è di 1'30'' per consentire l'amplificazione di un frammento più lungo.

Sono stati impiegati i seguenti primers per amplificare la regione di OPN corrispondente ai polimorfismi analizzati e per le reazioni di sequenza: OPN5'-TGCTTTATAGCAAATGAAAAG-3' (*forward*) e OPN 5'-CCACCAAATTCTTATTACATTCAA-3'(*reverse*). La concentrazione di MgCl₂ impiegata per l'amplificazione è di 3mM. Le condizioni di reazione sono le seguenti: 1 ciclo di denaturazione a 94° 5'; seguito da 35 cicli composti da una fase di denaturazione a 94°C per 20'', una di appaiamento a 63°C per 30'', e una di sintesi a 72°C per 30'. Segue infine un ciclo di sintesi a 72°C per 7'.

Elettroforesi su gel d'agarosio

Terminata la reazione di PCR, un'aliquota della reazione è stata caricata su un gel di agarosio in TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8, EDTA pH 8) ad una concentrazione dell'1% contenente bromuro d'etidio (0.5µg/ml). L'esposizione agli UV del gel permette il rilevamento del DNA grazie alla fluorescenza emessa dall'etidio bromuro incorporato dal campione.

Sequenziamento automatico.

I prodotti di PCR, sono stati purificati dall'eccesso di primers e dei nucleotidi non incorporati, utilizzando gli enzimi Exo I (1 unità) e SapI (5 unità) (ditta USB) tramite un ciclo di incubazione di 20' a 37°C e uno di 20' a 80°C.

Le reazioni di sequenziamento sono quindi state allestite servendosi del kit specifico ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v1.1 (Applied Biosistem), dotati di dideossinucleotidi ciascuno legato ad un fluorocromo differente. Seguendo il protocollo consigliato dalla ditta, per un volume finale di reazione di 10 μ l, sono stati addizionati al DNA purificato, 2 μ l di BigDye Sequencing Buffer (in dotazione con il kit) e 1 μ l primer (3,2 μ M/ μ l). La reazione di sequenziamento prevede l'utilizzo del seguente programma:

96°C 1'	}	1 ciclo
96°C 10''		} 25 cicli
50°C 5''		
60°C 4'		

Il prodotto della reazione è stato purificato, al fine di eliminare gli oligonucleotidi non incorporati, mediante il kit Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup (Montage). 5 μ l del purificato sono stati addizionati a 10 μ l di formammide e denaturati (3' a 95°C), quindi caricati su piastra ottica per la successiva analisi al sequenziatore.

Per il sequenziamento dell'esone 2 del gene di perforina è stata impiegata la coppia di primers usata nell'amplificazione mediante PCR. I prodotti di PCR dell'esone 3 sono stati invece sequenziati usando la seguente coppia di oligonucleotidi:

Forward: 5'- CAGGTCAACATAGGCATCCACG -3'

Reverse: 5'- GAACAGCAGGTCGTTAATGGAG -3'

Espressione di perforina mediante citofluorimetria.

L'espressione di perforina nelle cellule citotossiche è stata valutata mediante citofluorimetria sui PBMCs isolati da sangue eparinato. I PBMC sono stati prima incubati per 30 min a 4°C in PBS1X con gli anticorpi diretti contro gli antigeni di membrana. In seguito le cellule sono state fissate e permeabilizzate mediante l'impiego del kit "Fix & Perm cell permeabilization"(Caltag, Hamburg). Le cellule sono state successivamente lavate 2 volte con PBS1X addizionato di BSA (0.5g/l) (bovine serum albumin) e 0.02% di sodio azide (Sigma-Aldrich corporation, St Louis, Missouri) ed incubate per 30 min a 4°C con anticorpo anti-perforina coniugato con FITC. Le cellule sono state poi analizzate al citofluorimetro (FACScan, Becton-Dickinson, San Jose, CA)

Saggio di citotossicità.

Il saggio di citotossicità è stato effettuato misurando il rilascio di ^{51}Cr da parte delle cellule bersaglio. La valutazione dell'attività citotossica delle cellule NK è stata effettuata utilizzando come bersaglio la linea cellulare K562.

Le cellule bersaglio sono state trattate per 1 ora a 37°C con ^{51}Cr ($30\ \mu\text{Ci}$ [$1.11\ \text{MBq}$]/ 10^6 cellule; Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England) e lavate per tre volte con terreno di coltura prima dell'aggiunta delle cellule effettrici NK.

La lisi specifica è stata misurata in triplo, utilizzando 5×10^3 cellule K562 mescolate alle cellule effettrici in differenti rapporti (effettore/target 10:1, 30:1, 100:1) in un volume totale di $200\ \mu\text{l}$. La percentuale di lisi specifica è stata calcolata usando la seguente formula: $(\text{Rilascio di } ^{51}\text{Cr} \text{ nel campione} - \text{rilascio di } ^{51}\text{Cr} \text{ spontaneo} / \text{Rilascio di } ^{51}\text{Cr} \text{ totale} - \text{rilascio di } ^{51}\text{Cr} \text{ spontaneo}) \times 100$.

Analisi statistica.

Per quello che riguarda la comparazione dell'attività delle cellule NK e dell'espressione di perforina è stato impiegato il test Mann-Whitney U. La distribuzione dei genotipi è stata analizzata con il test del Chi quadro o Fisher. Tutti i valori assunti dalle p avevano due code (cut-off $P < 0,05$).

RISULTATI

1-Analisi del gene di perforina in pazienti con ALPS e pazienti con DALD

I pazienti con ALPS e quelli con FHL hanno in comune il quadro linfoproliferativo ed una maggior suscettibilità allo sviluppo di linfoma. Inoltre, alla base di entrambe le patologie, vi sono mutazioni in geni coinvolti nel processo di citotossicità cellulo-mediata, rispettivamente Fas e Perforina. Poiché l'insorgenza di FHL richiede la presenza di mutazioni bialleliche nel gene di perforina, ci siamo chiesti se variazioni monoalleliche, insufficiente ad indurre lo sviluppo di FHL, potessero invece favorire lo sviluppo di ALPS/DALD.

Abbiamo ricercato variazioni nucleotidiche del gene di perforina in 14 pazienti con ALPS e 28 pazienti con DALD, mediante il sequenziamento degli esoni 2-3 e delle regioni introniche confinanti. Entrambi i gruppi di pazienti mostrano manifestazioni autoimmuni, linfadenopatie e/o splenomegalia e una difettiva funzionalità di Fas. L'analisi è stata estesa anche a 816 soggetti sani di controllo, per stabilire la frequenza dei singoli polimorfismi nella popolazione italiana.

Sono state identificate 6 variazioni nucleotidiche, 3 delle quali sono localizzate nell'esone 2 (C272T, G435A e A462G) e le altre nell'esone 3 (A755G, C822T e T900C). La suddetta numerazione è riferita al cDNA considerando l'adenina della tripletta di inizio ATG come +1 (accession number: M28393). Solo due di queste variazioni causano una sostituzione aminoacidica: la variazione C272T cambia il codone 91-GCG, codificante per un'alanina, nel codone GTG che codifica per una valina; analogamente la variazione A755G sostituisce un'asparagina con una serina.

La variazione N252S è stata trovata in 2 pazienti con ALPS (ALPS-5 e ALPS-11), 2 controlli e nessun paziente con DALD. La frequenza allelica era significativamente aumentata nei pazienti ALPS rispetto ai controlli (7,5% vs 0,1%, $P=0,0016$) ed incrementava di circa 63 volte il rischio di sviluppare ALPS (O.R.=62.7, 95%CI:6-654,9). Questa variazione è stata già descritta nel paziente ALPS-5 in un precedente lavoro (Clementi *et al.*, 2004).

La variazione A91V è stata trovata solo in 6 pazienti con DALD (in eterozigosi in 5 pazienti: DALD-3,-6,-9, -14, -25; ed in omozigosi in un solo paziente: DALD-10), in 72 controlli e in nessun paziente con ALPS. La frequenza allelica era significativamente aumentata nei pazienti DALD rispetto ai controlli (12,5 vs 4,6%, $P=0,01$) e aumentava di circa 3 volte il rischio di sviluppare DALD (O.R.=3, 95%CI:1.2-7.1) [tabella 1]. La distribuzione genotipica di queste variazioni (A91V e N252S) è in equilibrio di Hardy-Weinberg in ciascun gruppo.

Per quanto riguarda le restanti 4 variazioni nucleotidiche identificate, due (C822T e T900C) sono state precedentemente descritte come comuni polimorfismi non associati alla FHL. La loro

frequenza era simile nei pazienti e nei controlli. Infine, le variazioni G435A e A462G sono in perfetto *linkage disequilibrium* con la sostituzione A/G in posizione 755 (N252S) e sono state identificate solo nei 4 soggetti portatori di questa variazione.

VARIAZIONE NUCLEOTIDICA	GENOTIPI	ALPS		DALD		CONTROLLI	
		N	(%)	N	(%)	N	(%)
PRF1 N252S	NN	12	(85,7)	28	(100)	814	(99,8)
	NS	2	(14,3)	0	(0)	2	(0,2)
	SS	0	(0)	0	(0)	0	(0)
P=0,0016 O.R=62.7 , (95%CI: 6-654,9)							
PRF1 A91V	AA	14	(100)	22	(78,5)	744	(91,2)
	AV	0	(0)	5	(17,9)	69	(8,4)
	VV	0	(0)	1	(3,6)	3	(0,4)
P=0.01 O.R=3 (95%CI: 1.2-7.1)							

Tabella 1. Distribuzione della frequenza delle variazioni A91V e N252S nei 14 pazienti ALPS, 28 pazienti DALD e 816 controlli. (N=numero di soggetti)

2-Effetti sinergici delle variazioni dei geni di perforina e osteopontina nella predisposizione allo sviluppo dell'ALPS/DALD

Abbiamo recentemente descritto alcuni alleli del gene della citochina osteopontina (OPN) capaci di favorire lo sviluppo della DALD. Questi alleli che costituiscono gli aplotipi 282C-750T-1083A-1239C e 282C-750T-1083G-1239C (denominati OPN^{high}) inducono la produzione di elevate quantità di OPN, la quale favorisce la risposta infiammatoria (Chiocchetti *et al.*, 2004).

Abbiamo quindi valutato se le variazioni di PRF1 e OPN potessero avere un effetto di cooperatività nello sviluppo dell'ALPS/DALD. Il gene di osteopontina è stato sequenziato in tutti i pazienti e in 134 controlli ed è stata stabilita la frequenza della co-presenza dei genotipi di PRF1 e OPN nella suscettibilità alla malattia.

Questa analisi ha dimostrato che la co-presenza di A91V e degli alleli OPN^{high} conferisce un rischio di sviluppare DALD di circa 17 volte superiore relativamente all'assenza di entrambi i fattori di suscettibilità (O.R=17, 95%CI:2,7-122; p=0,0007) e di 9 volte superiore relativamente alla presenza di un unico fattore (O.R= 8,8, 95%CI:1,7-50,5; p=0,004). Tale cooperazione non è stata riscontrata nei pazienti ALPS, dal momento che nessun paziente è portatore di entrambi i fattori [tabella 2].

GENOTIPI DI SUSCETTIBILITA'	ALPS	DALD	CONTROLLI
--------------------------------	------	------	-----------

	N	(%)	N	(%)	N	(%)
NESSUNO	4	(28,6)	6	(21,4)	51	(38,1)
PRF1	2	(14,3)	0	(0)	10	(7,5)
OPN	8	(57,1)	16	(57,2)	70	(52,2)
PRF1+OPN	0	(0)	6	(21,4)	3	(2,2)

Tabella 2. Frequenza della distribuzione dei genotipi di suscettibilità di PRF1 e OPN (N=numero di soggetti)

3- Associazione di una difettiva funzionalità di Fas con le variazioni nel gene di perforina

Al fine di valutare la componente genetica delle mutazioni identificate abbiamo tipizzato anche i familiari dei pazienti.

Nel paziente ALPS-5 (N252S) è stata precedentemente descritta una mutazione in eterozigosi del gene di Fas (Clementi *et al.*, 2004). La mutazione N252S in perforina è stata ereditata dalla madre, mentre la mutazione in Fas è stata ereditata dal padre che ha trasmesso l'allele anche al fratello del paziente e cosegrega con una difettiva funzionalità di Fas. Tutti i familiari, presentano solo una delle mutazioni e sono sani. Nel paziente ALPS-11 non è stata trovata una mutazione in Fas e l'analisi di ereditarietà è stata condotta studiando la funzionalità di Fas e sequenziando il gene di perforina nei suoi familiari. La variazione N252S è stata ereditata dal padre, mentre la funzionalità di Fas è risultata difettiva solo nella madre. Le alterazioni in Fas e perforina vengono ereditate da uno dei due genitori, sani. **[figura 1A]**.

La stessa analisi è stata condotta in 3 pazienti DALD portatori della variazione A91V (DALD-3,-6,-10) e nei loro familiari **[figura 1B]**. Nella famiglia del paziente DALD-3, la variazione A91V è stata ereditata dalla madre che ha trasmesso l'allele anche alla sorella del paziente; inoltre, la funzionalità di Fas è difettiva sia nei genitori che nella sorella. I genitori del paziente sono sani, mentre la sorella presentava immunodeficienza comune variabile (CVID). Inoltre, il paziente ha sviluppato ipogammaglobulinemia alcuni anni dopo l'esordio della malattia.

Nella famiglia del paziente DALD-6, la funzionalità di Fas è difettiva nei genitori, mentre la variazione A91V è stata ereditata dalla madre che ha trasmesso l'allele alla sorella; entrambi i soggetti portatori della variazione sono sani. Infine, nella famiglia del paziente DALD-10, la funzionalità di Fas è difettiva sia genitori che nella sorella, e la variazione A91V (in omozigosi) è stata ereditata dai due genitori, entrambi sani. Inoltre, alcuni componenti delle 3 famiglie analizzate sono portatori degli alleli OPN^{high}.

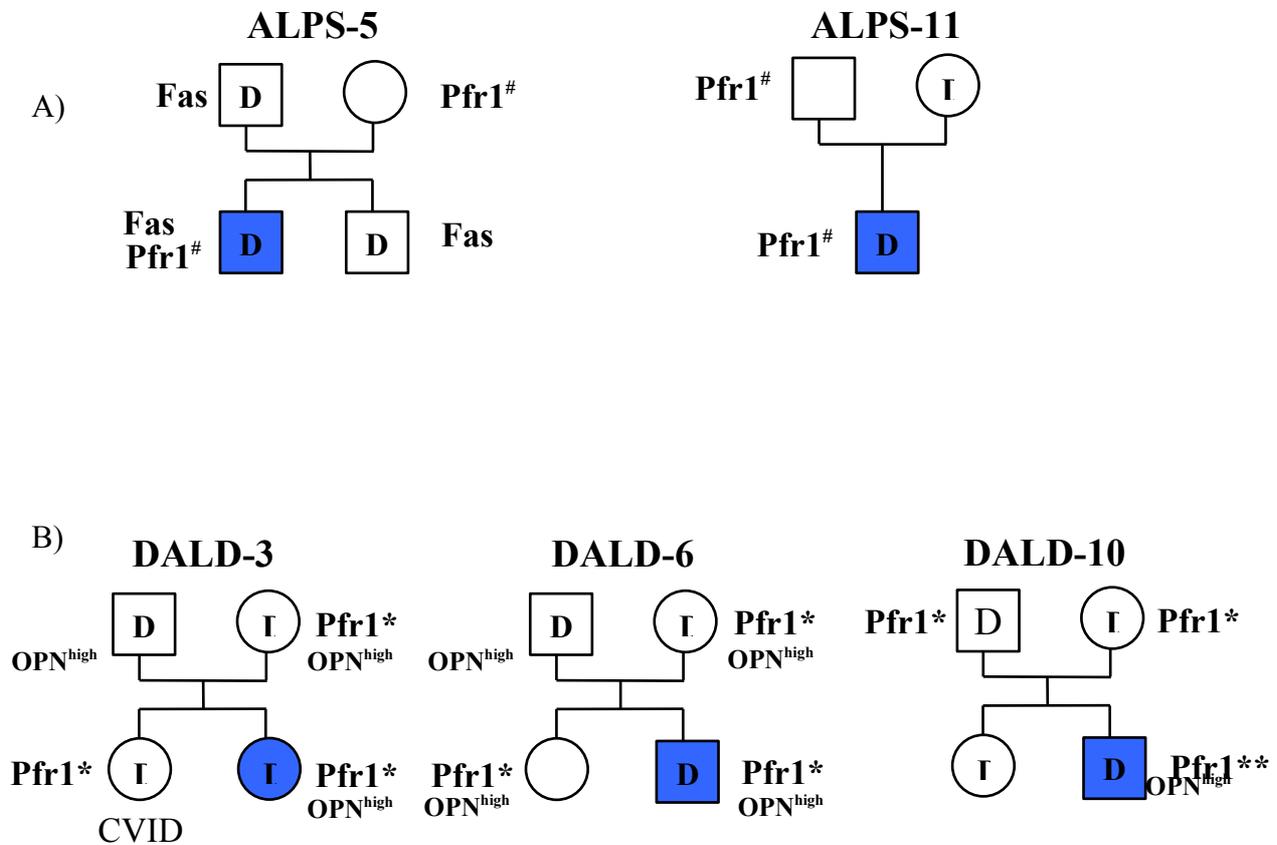


Figura 1. Alberi genealogici dei pazienti ALPS-5 e-11, e DALD-3,-6,-10 e dei loro genitori (come descritto nel testo). Pfr1[#] indica la mutazione N252S di perforina, D= difettiva funzionalità di Fas, Pfr1* indica la variazione A91V, Pfr1** indica gli omozigoti A91V. Sono riportati di alcuni soggetti gli aplotipi 282C-750T-1083A-1239C e 282C-750T-1083G-1239C (denominati OPN^{high}) del gene di osteopontina.

4- Le variazioni A91V e N252S correlano con un'alterata funzione e/o espressione di perforina

Al fine di valutare se le due variazioni identificate alterassero l'attività delle cellule NK, è stato allestito un saggio di citotossicità mediante il test del rilascio di ⁵¹Cr. È stata utilizzata la linea cellulare K562 come cellula bersaglio, in quanto sensibile alla citotossicità mediata dalle cellule NK stesse. I risultati mostrano che i livelli di attività delle cellule NK sono significativamente più bassi nei pazienti portatori della variazione A91V (P=0,015) rispetto ai controlli; mentre i valori nei soggetti portatori della mutazione N252S sono confrontabili a quelli rilevati nei controlli sani [figura 2].

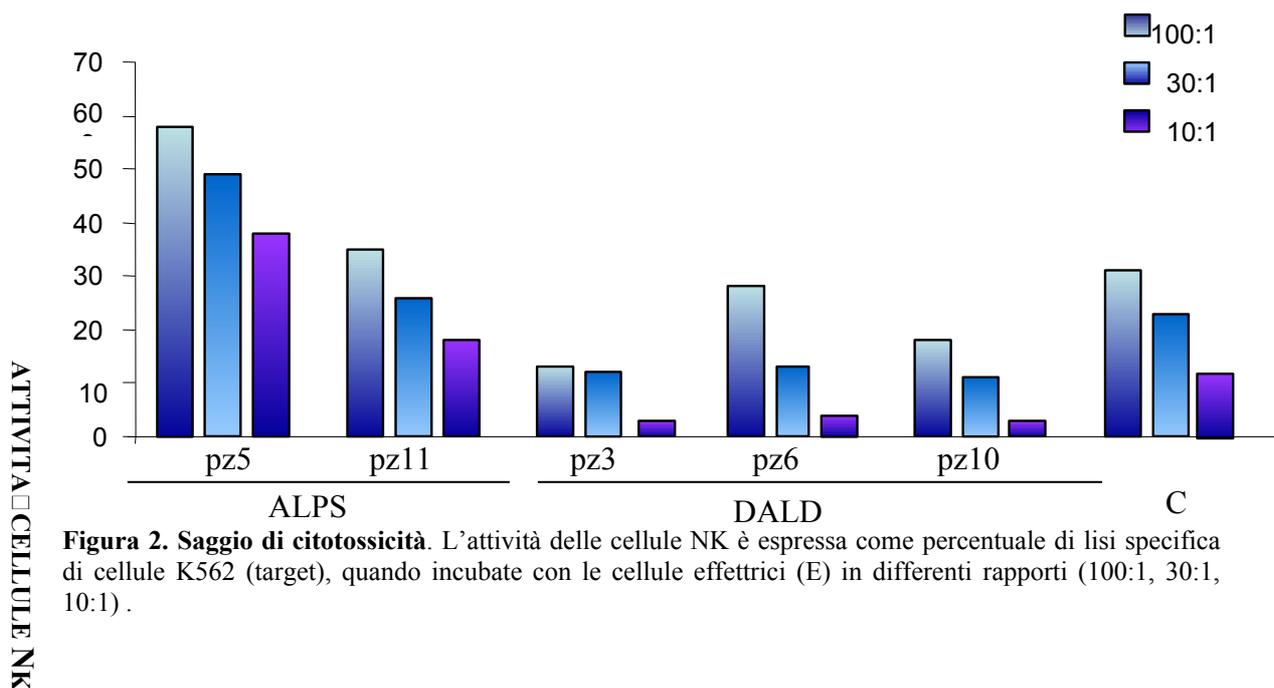


Figura 2. Saggio di citotossicità. L'attività delle cellule NK è espressa come percentuale di lisi specifica di cellule K562 (target), quando incubate con le cellule effettrici (E) in differenti rapporti (100:1, 30:1, 10:1).

Un dato interessante però si deduce da uno studio retrospettivo effettuato, mediante saggi analoghi, sulle cellule NK derivate del paziente ALPS-11 durante il decorso della malattia: tali test sono stati eseguiti all'età di dodici, cinque e tre anni [figura 3]. I risultati mostrano che la attività delle cellule NK era marcatamente ridotta o assente alla età di 3 anni, iniziava poi ad essere rilevabile a cinque anni e si normalizzava nell'adolescenza (dodici anni). Questo suggerisce che ci possa essere stato un meccanismo compensatorio in grado di superare il difetto durante lo sviluppo. Nel paziente ALPS-5 l'attività NK è stata valutata all'età di 30 anni.

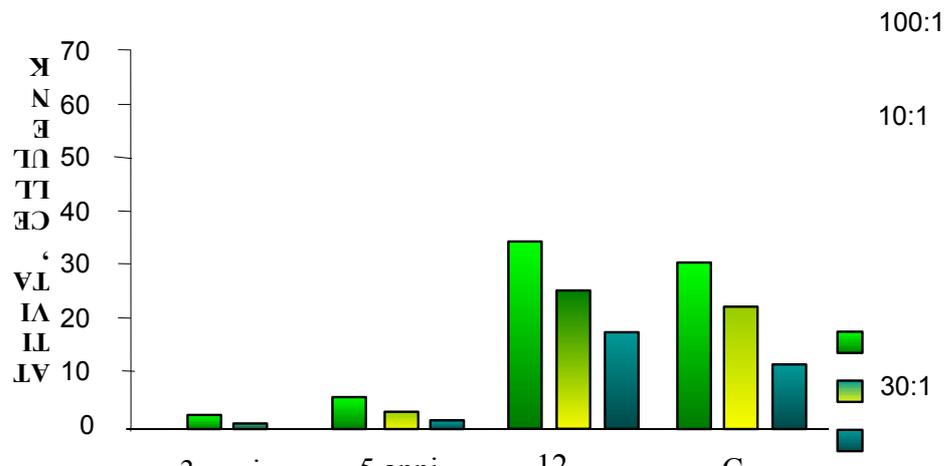


Figura 3. Saggio di citotossicità. L'attività delle cellule NK del paziente ALPS-11 è espressa come percentuale di lisi specifica di cellule K562 (target), quando incubate con le cellule effettrici (E) in differenti rapporti (100:1, 30:1, 10:1). Il grafico mostra che all'età di tre e cinque anni il paziente presentava un deficit della funzione citotossica delle cellule NK, che si normalizzava nell'adolescenza (12 anni).

Per saggiare l'influenza delle due variazioni A91V e N252S sull'espressione della proteina abbiamo eseguito un'immunofluorescenza intracitoplasmatica con successiva analisi citofluorimetrica.

I risultati mostrano che l'espressione di perforina è leggermente diminuita nei pazienti ALPS-5, DALD-6 e DALD -10, ma normale negli altri soggetti; sebbene la proporzione di cellule NK (CD3-CD56+ e CD3-CD16+) è compresa nell'intervallo di normalità in tutti i soggetti. **[figura 4].**

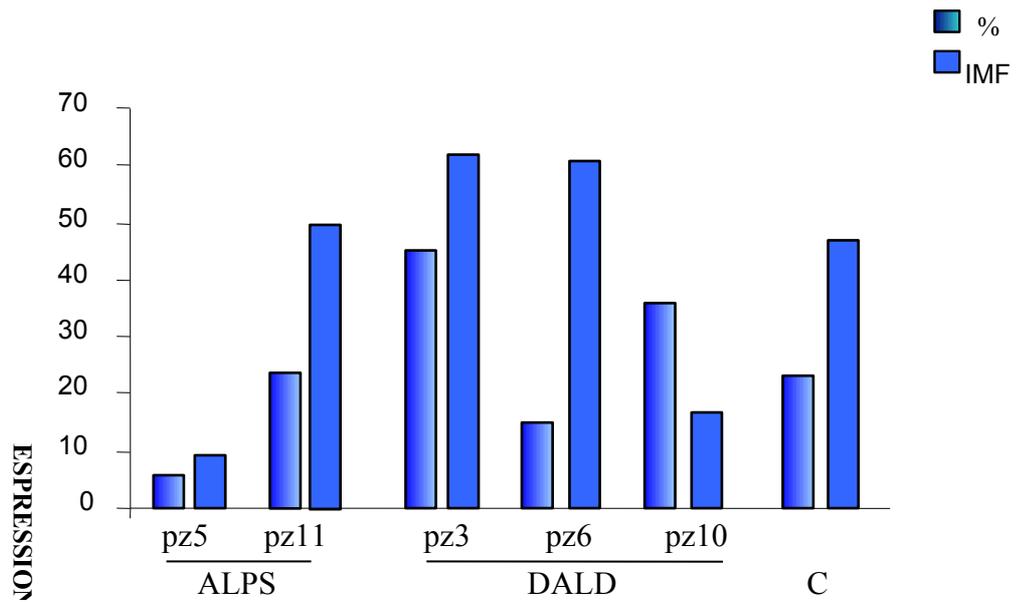


Figura 4. Valutazione dell'espressione di perforina. L'espressione di perforina è mostrata come proporzione di cellule positive (%) e valutazione delle intensità di fluorescenza (MFI).

ERFORINA

DISCUSSIONE

I pazienti con sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS) sono portatori di difetti funzionali a carico del sistema Fas/FasL e sviluppano malattie autoimmuni e linfoproliferazione non neoplastica con linfadenopatia e/o splenomegalia e eventuale espansione di linfociti T doppi negativi per CD4 e CD8 (DN) (Rieux-Leucat *et al.* 1995).

Diverse evidenze suggeriscono che l'ALPS sia geneticamente eterogenea: in differenti famiglie possono essere coinvolti geni diversi e alterazioni geniche multiple possono essere necessarie per lo sviluppo della malattia. Ad oggi sono stati identificati tre possibili geni associati alla malattia, ma la loro mutazione è presente solamente in una minoranza di pazienti e permette di individuare i sottotipi di malattia ALPS-Ia (mutazione di Fas), ALPS-Ib (mutazione di FasL) e ALPS-II (mutazione di caspasi 10). Generalmente la mutazione identificata è presente in eterozigosi, ma da sola non è sufficiente per lo sviluppo della malattia, ciò è dimostrato dal fatto che il genitore portatore della mutazione è sano. Inoltre, i genitori di questi pazienti presentano deficit funzionali nell'apoptosi Fas-mediata, il che suggerisce che entrambi siano portatori di alterazioni geniche responsabili del difetto apoptotico, ma non sufficienti per determinare lo sviluppo della malattia; questa richiederebbe pertanto la co-trasmissione di entrambe le alterazioni geniche al figlio. Resta un'ampia casistica di pazienti, definiti ALPSIII in cui non è stato riscontrato il gene associato alla malattia. In questo ambito, il nostro laboratorio ha individuato una sindrome ALPS-simile, definita DALD (*Dianzani's Autoimmune lymphoproliferative disease*) che, pur manifestando sintomi diagnostici identici all'ALPS, manca dell'espansione periferica dei linfociti T doppi negativi (DN).

In passato il nostro laboratorio ha descritto in un paziente ALPS (ALPS-5) la co-presenza di due mutazioni in eterozigosi rispettivamente nel gene di Fas e nel gene di perforina; ciò ha suggerito che potessero concorrere nello sviluppo della malattia nel paziente.

L'obbiettivo di tale progetto è stato di estendere l'analisi del gene perforina in una casistica di pazienti ALPS/DALD molto più ampia e di valutarne il ruolo nello sviluppo della malattia.

La variazione N252S di perforina, identificata precedentemente nel paziente ALPS-5, è risultata essere molto più frequente nei pazienti ALPS rispetto ai controlli; mentre la frequenza di una seconda variazione associata alla FHL, l' A91V, è risultata significativamente più elevata nei pazienti DALD.

La mutazione N252S, identificata in 2/14 pazienti ALPS (ALPS-5 e -11), aumenta il rischio di sviluppo l'ALPS di circa 63 volte ed è stata riscontrata in 2/816 controlli sani; tale frequenza è simile a quella riportata da altri studi (Voskoboinik *et al.*, 2004) Tale variazione cade in una regione

di perforina detta MAC (Membrane-Attack Complex), che sembra essere critica per la formazione di pori nella membrana della cellula bersaglio ma la sua rilevanza funzionale è argomento di dibattito in quanto è stata associata ad una normale attività delle cellule NK (Stepp *et al.*, 1999). come abbiamo riscontrato nei nostri due pazienti portatori di tale variazione (ALPS-5 e -11). L'osservazione che il paziente ALPS-11 mostrava un pregresso marcato deficit di attività NK durante l'infanzia, suggerirebbe che la mutazione N252S è associata ad altri fattori che riducono la funzione delle cellule NK, deficit successivamente superato grazie all'attivazione di qualche meccanismo di compenso.

La variazione A91V, identificata in 6/28 pazienti DALD, aumenta il rischio di sviluppare la DALD di circa 3 volte ed è risultata essere molto frequente nei controlli (4,6%), come riportato in altri lavori. (Molleran Lee *et al.*, 2004). Tale variazione altera la conformazione della proteina, ne riduce la stabilità e ne aumenta la degradazione (Voskoboinik *et al.*, 2005). In accordo con questa osservazione i nostri pazienti DALD presentano una ridotta attività delle cellule NK, in particolare con dosi di effettore/target più bassi. Questi dati suggeriscono che variazioni nel gene di perforina, associate ad una difettiva funzionalità di Fas, possono favorire lo sviluppo dell'ALPS/DALD. Inoltre la funzionalità di Fas è normale nei pazienti affetti da FHL e non concorre allo sviluppo della malattia (Fadeel *et al.*, 2001).

Lo studio dell'ereditarietà delle variazioni identificate nelle famiglie dei pazienti ha mostrato che la variazione A91V, associata ad una difettiva funzionalità di Fas, non è però sufficiente per favorire lo sviluppo della DALD, dal momento che i familiari sani sono portatori di entrambe le alterazioni. Il rischio di sviluppare DALD viene però incrementato di 17 volte dalla copresenza degli alleli OPN^{high}, ma la loro combinazione con la variazione A91V e il difetto di Fas non è sufficiente per indurre lo sviluppo della malattia, poiché tale combinazione è stata altresì riscontrata nei familiari dei pazienti.

La combinazione della variazione N252S con il difetto di Fas sembra invece avere un effetto più marcato rispetto all'A91V, dal momento che tale associazione è stata trovata solo nei pazienti. Comunque questa combinazione non è sufficiente per indurre lo sviluppo dell'ALPS. E' stato descritto un paziente ALPS portatore della variazione N252S e della mutazione in Fas, mutazioni ereditate dal padre sano (Rieux-Laucat, 1995). L'osservazione che la variazione A755G (N252S) è in perfetto linkage disequilibrium con altre due variazioni nucleotiche, G435A e A462G, suggerirebbe che queste o altre variazioni incluse in un aplotipo ancestrale possano avere un ruolo nello sviluppo dell'ALPS.

Questo studio dimostra che alcune variazioni del gene di perforina possono favorire lo sviluppo di ALPS/DALD, quando sono presenti difetti ereditari della funzionalità di Fas, attraverso

diversi meccanismi che altererebbero il processo di spegnimento della risposta immunitaria, la citotossicità cellulo-mediata e determinerebbero un rallentamento della *clearence* virale. Inoltre, un deficit nell'apoptosi Fas-mediata può compromettere la capacità dell'organismo di proteggersi dalla trasformazione neoplastica dei linfociti, mediante il fallimento della sorveglianza immunitaria. In questo contesto, potrebbe risultare critica l'integrità della via perforina-granzima.

BIBLIOGRAFIA

- Akashi, K., Hayashi, S., Gondo, H., Mizuno, S., Harada, M., Tamura, K., Yamasaki, K., Shibuya, T., Uike, N., Okamura, T., Miyamoto, T. & Niho, Y. Involvement of interferon-gamma and macrophage colony-stimulating factor in pathogenesis of haemophagocytic lymphohistiocytosis in adults. *British J. Haematol.* 87, 243-250, 1994.
- Arico, M., Janka, G., Fischer, A., Henter, J.I., Blanche, S., Elinder, G., Martinetti, M. & Rusca, M.P. for the FHL Study Group of the Histiocyte Society Haemophagocytic lymphohistiocytosis: report of 122 children from the *International Registry. Leukemia*, 10, 197-203, 1996.
- Arnaout, R.A.: Perforin deficiency: fighting unarmed? *Immunology Today*, 21, 52, 2000.
- Ashkenazi A., Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308, 1998
- Baker S.J., Reddy E.P. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17, 3261-3270, 1998.
- Balaji, K.N., Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M. & Henkart, P.A. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J. Exp. Med.* 196, 493-503, 2002
- Barry M., Bleackley R.C. Cytotoxic T lymphocytes: all nodes lead to death. *Nat.Rev.Immunol.*2:401-9, 2002.
- Bink E.J., Trapani J.A., Jans D.A. Perforin –dependent nuclear targeting of granzymes: a central role in the nuclear events of granul-exocytosis-mediated apoptosis? *Immunol. Cell Biol.* 77(3), 206-215, 1999.
- Bossy-Wetzell E., Green D.R. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mut. Res.* 434, 243-251, 1999.
- Busiello, R., Adriani, M., Locatelli, F., Galgani, M., Fimiani, G., Clementi, R., Ursini, M.V., Racioppi, L. & Pignata, C. Atypical features of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*, 103, 4610-4612, 2004
- Chiocchetti A., Indelicato M., Bensi T., Mesturini R., Giordano M., Sametti S., Castelli L., Bottarel F., Mazzarino M.C., Garbarini L., Giacomelli F., Valesini G., Santoro C., Dianzani I., Ramenghi U., Dianzani U.: High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 103(4),1376-82, 2004
- Choi Y, Ramnath VR, Eaton AS, Chen A, Simon-Stoos KL, Kleiner DE, Erikson J, Puck JM. Expression in transgenic mice of dominant interfering Fas mutations: a model for human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clin. Immunol.* 93(1):34-45, 1999.
- Clementi R, Dagna L, Dianzani U, Dupré L, Dianzani I, Ponzoni M, Cometa A, Chiocchetti A, Sabbadini MG, Rugarli C, Ciceri F, Maccario R, Locatelli F, Danesino C, Ferrarini M, Bregni, M. Inherited Perforin and Fas Mutations in a Patient with Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome and Lymphoma. *N Engl J Med* 351:1419-24, 2004.
- Clementi, R., Emmi, L., Maccario, R., Liotta, F., Moretta, L., Danesino, C. & Arico, M. Adult onset and atypical presentation of hemophagocytic lymphohistiocytosis in siblings carrying PRF1 mutations. *Blood*, 100, 2266-2267, 2002.
- Davidson W.F., Giese T., Fredrickson T.N. Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas-Fas ligand interactions. *J. Exp. Med.* 187, 1825-1838, 1998.
- De Maria R., Lenti L., Malisan F. et al.: Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science* 277, 1652-1655, 1997.
- Desagher S, J.C. Martinou. Mitochondria as the central control point of apoptosis, *Trend in Cell Biology* 10, 2001

- Dianzani U, Bragardo M, DiFranco D, Alliaudi C, Scagni P, Buofiglio D, Redoglia V, Bonissoni S, Correr A, Dianzani I, Ramenghi U. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferations. *Blood* 89:2871-2879, 1997.
- Fadeel B, Orrenius S, Henter JI. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: too little cell death can seriously damage your health. *Leuk Lymphoma*. 2001 Jun;42(1-2):13-20.
- Fadeel, B., Orrenius, S. & Henter, J.I. Induction of apoptosis and caspase activation in cells obtained from familial haemophagocytic lymphohistiocytosis patients. *Br. J. Haematol.* 106, 406-415, 1999.
- Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., Lambert, N., Ouachee-Chardin, M., Chedeville, G., Tamary, H., Minard-Colin, V., Vilmer, E., Blanche, S., Le Deist, F., Fischer, A. & de Saint Basile, G. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 115, 461-473, 2003.
- Feldmann, J., Le Deist, F., Ouachee-Chardin, M., Certain, S., Alexander, S., Quartier, P., Haddad, E., Wulffraat, N., Casanova, J.L., Blanche, S., Fischer, A. & de Saint Basile, G. Functional consequences of perforin gene mutations in 22 patients with familial haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br. J. Haematol.* 117, 956-972, 2002
- Gomez-Angelats M, Cidlowski JA. Protein Kinase C Regulates FADD Recruitment and Death-inducing Signaling Complex Formation in Fas/CD95-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276(48):44944-44952, 2001
- Goransdotter Ericson, K., Fadeel, B., Nilsson-Ardnor, S., Soderhall, C., Samuelsson, A., Janka, G., Schneider, M., Gurgey, A., Yalman, N., Revesz, T., Egeler, R., Jahnukainen, K., Storm-Mathiesen, I., Haraldsson, A., Poole, J., de Saint Basile, G., Nordenskjold, M. & Henter, J. Spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 590-597, 2001.
- Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312, 1998.
- Griffith T.S., Brunner T., Fletcher S.M. et al. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270, 1189-1192, 1995.
- Hasegawa D., Kojima S., Tatsumi E., et al. Elevation of the serum Fas ligand in patients with hemophagocytic syndrome and Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 91, 2793-2799, 1998.
- Henter, J.I., Carlson, L.A., Soder, O., Nilsson-Ehle, P. & Elinder, G. Lipoprotein alterations and plasma lipoprotein lipase reduction in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Acta Paediatrica Scandinavica* 80, 675-681, 1991.
- Hofmann TG, Moller A, Hehner SP, Welsch D, Droge W, Schmitz ML. CD95-induced JNK activation signals are transmitted by the death-inducing signaling complex (DISC), but not by Daxx. *Int. J. Cancer* 93(2):185-191, 2001
- Hu Y., Benedict M.A., Wu D. et al. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4386-4391, 1998.
- Ishii E., Ohga S., Aoki T., et al. Prognosis of children with virus-associated hemophagocytic syndrome and malignant histiocytosis: correlation with levels of serum interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Acta Haematol.* 85, 93-99, 1991.
- Jackson C.E., Fisher R.E., Hsu A.P., Anderson S.M., Choi Y., Wang J., Dale J.K., Fleisher T.A., Middleton L.A., Sneller M.C., Lenardo M.J., Straus S.E., Puck J.M. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective fas: genotype influences penetrance. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 1001-1014, 1999.
- Jordan, M.B., Hildeman, D., Kappler, J. & Marrack, P.: An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) CD8+ T cells and interferon gamma are essential for the disorder. *Blood* 104, 735-743, 2004.

- Kagi, D., Ledermann, B., Burkl, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K.J., Podack, E.R., Zinkernagel, R.M. & Hengartner, H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369, 31-37, 1994.
- Kogawa, K., Lee, S.M., Villanueva, J., Marmer, D., Sumegi, J. & Filipovich, A.H. Perforin expression in cytotoxic lymphocytes from patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis and their family members. *Blood* 99, 61-66, 2002.
- Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssiere J.C., Mignotte B.: The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* 9, 1277-1287, 1995.
- Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.* 276(23), 2001.
- Kumar S. Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Diff.* 6, 1060-1066, 1999.
- Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J.: Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94(4), 491-501, 1998.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489, 1997.
- Lichtenheld, M.G., Olsen, K.J., Lu, P., Lowrey, D.M., Hameed, A., Hengartner, H. & Podack, E.R. Structure and function of human perforin. *Nature* 335, 448-451, 1989.
- Los M, C. Stroh, R. U. Janiche, I. H. Engels, K. Schulze-Osthoff Caspases: more than just killers? *Trends in Immunology* Vol.22 No.1, 2001.
- Luo X. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490, 1998.
- Medema J.P, C. Scaffidi, F.C. Kischkel, A. Shevchenko, M. Mann, P. H. Krammer, M. E. Peter FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *The EMBO Journal* 16 10: 2794-2804, 1997.
- Molleran Lee, S., Villanueva, J., Sumegi, J., Zhang, K., Kogawa, K., Davis, J. & Filipovich, A.H. Characterisation of diverse PRF1 mutations leading to decreased killer cell activity in North American families with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J. Med. Genet.* 41, 137-144, 2004.
- Moretta, L., Moretta, A., Hengartner, H. & Zinkernagel, R.M. On the pathogenesis of perforin defects and related immunodeficiencies. *Immunology Today* 21, 593-594, 2000.
- Motyka B., Korbutt G., Pinkoski M.J., Heiben J.A., Caputo A., Hobman M., Barry M., Shostak I., Sawchuk T., Holmes C.F. Mannose 6-phosphate/insuline like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 103, 491-500, 2000.
- Mountz J.D., Cheng J., Su X., Wu J., Zhou T. Autoimmunity, apoptosis defects and retroviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 374, 183-201, 1995.
- Muschen M., Rajewsky K., Kronke M., Kuppers R. The origin of CD95-gene mutations in B-cell Lymphoma. *Trends Immunol.* 23, 75-80, 2002.
- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 267,1449-1456, 1995.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365, 1997.
- Ohadi, M., Lalloz, M.R., Sham, P., Zhao, J., Dearlove, A.M., Shiach, C., Kinsey, S., Rhodes, M. & Layton, D.M. Localization of a gene for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis at chromosome 9q21.3-22 by homozygosity mapping. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 165-171, 1999.
- Osugi, Y., Hara, J. & Tagawa, S. Cytokine production regulating Th1 and Th2 cytokines in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*, 89, 4100-4103, 1997.
- Ricci-Vitiani L., Conticello C., Zeuner A., De Maria R. CD95/CD95L interactions and their role in autoimmunity. *Apoptosis* 5(5), 419-424, 2000.

- Rieux-Leucat F, Le Deist F, Hivroz C, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268:1347-1349, 1995.
- Sharma K., Wang R.X., Zhang L.Y., Yin D.L., Luo X.Y., Solomon J.C., Jiang R.F., Markos K., Davidson W., Scott D.W., Shi Y.F. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol. Ther.* 88(3), 333-347, 2000.
- Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr. Opin. Immunol.*;10(5):581-7, Oct 1998.
- Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien, RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288(5475):2354-2357, 2000.
- Slee E.A., Adrian C., Martin S.J. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Diff.* 6, 1067-1074, 1999.
- Smyth M.J., Thia K.Y., Street S.E., MacGregor D., Godfrey D.I., Trapani J.A. Perforin mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J. Exp. Med.* 192, 755-760, 2000.
- Smyth M.J., Wiltout T., Trapani J.A., Ottaway K.S., Sowder R., Henderson L.E. Purification and cloning of a novel serine protease, RNK-Met-1, from the granule of a rat natural killer cell leukemia. *J. Biol. Chem.* 267, 24418-24425, 1992.
- Stepp S.E., Dufourcq-Lagelouse R., Le Deist F., Bhawan S., Certain S., Mathew P.A., Henter J.I., Bennett M., Fischer A., De Saint Basile G. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* 286, 1957-1959, 1999.
- Straus S.E., Jaffe E.S., Puck J.M., Dale J.K., Elkon K.B., Rosen-Wolff A., Peters A.M.J., Sneller M., Hallahan C.W., Wang j., Fischer R.E., Jackson C.M., Lyn A.Y., Baumler E., S., Marx A., Vaishnav A.K., Grodzicky T., Fleisher T.A., Lenardo M.J. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 98, 194-199, 2001
- Suga, N., Takada, H., Nomura, A., Ohga, S., Ishii, E., Ihara, K., Ohshima, K. & Hara, T. Perforin defects of primary haemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Br. J. Hematol.* 116, 346-349, 2002.
- Takada H., Nomura A., Ohga S., Hara T. Interleukin-18 in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Leuk. Lymphoma* 42, 21-28, 2001.
- Thornberry N.A., Lazebnik Y. Caspases:enemies within. *Science* 281, 1312-1316, 1998.
- Trapani J.A, Smyth M.J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat.Rev.Immunol.* 2:735-47, 2002.
- Trapani J.A, Sutton V.R. Granzyme B:pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Curr.Opin.Immunol.*15:533-43,2003.
- Trapani JA, Sutton VR, Smyth MJ. CTL granules: evolution of vesicles essential for combating virus infections. *Immunol. Today* 20(8):351-6, Aug 1999.
- Uellner, R., Zvelebil, M.J., Hopkins, J., Jones, J., MacDougall, L.K., Morgan, B.P., Podack, E., Waterfield, M.D. & Griffiths, G.M. Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain. *The EMBO Journal* 16, 7287-7296, 1997.
- Voskoboinik I, Thia MC, Trapani JA. A functional analysis of the putative polymorphisms A91V and N252S and 22 missense perforin mutations associated with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood.* 2005 15;105(12):4700-6.
- Voskoboinik, I., Thia, M-C., De Bono, A., Browne, K., Cretney, E., Jackson, J.T., Darcy, P.K., Jane, S.M., Smyth, M.J. & Trapani, J.A. The functional basis for hemophagocytic lymphohistiocytosis in a patient with co-inherited missense mutations in the perforin (PFN1) gene. *J. Exp. Med.* 200, 811-816, 2004.

- Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, Sneller M, Yao X, Puck JM, Straus SE, Lenardo MJ. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*. 98(1):47-58, 1999.
- Wu JG, Wilson J, He , Xiang LB, Schur PH , Montz JD: Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J. Clin. Invest.*98:1107-1113, 1996.

ATTIVITA' FORMATIVA SVOLTA:

- Corso di Inglese. Docente: Prof. Irving Bell.

SEMINARI INTERNI AL DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

Anno Accademico 2005/06

18 Novembre 2005

Dr. Diego Cotella

“Cardiac Potassium channel regulation by accessori subunits”

23 Novembre 2005

Prof. Luigi Elio Adinolfi

“HCV-related steatosis: pathogenic mechanism and clinical implications”

25 novembre 2005

Prof. Robert Tjian

“Mechanism of transcriptional regulation and disease”

19 Gennaio 2006

Prof. Maria Grano

“Mechanism of osteolytic lesions in multiple mieloma: uncoupling between bone resorption and formation”

13 Febbraio 2006

Prof. Ferdinando Nicoletti

“New perspectives in metabotropic glutamate receptors”

15 Febbraio 2006

Prof. Daniele Sblattero

“Anticorpi ricombinanti: un potente tool biotecnologico”

13 Marzo 2006

Dr. Antonia Follenzi

“Il trapianto di cellule endoteliali (les) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell'emofilia”

20 Marzo 2006

Dr. Mikael Knip

“The Natural course of preclinical type I Diabetes”

6 Aprile 2006

Dott. Francesco Forconi

Aspetti immunogenetici e terapeutici della “hairy cell leukemia”

20 Aprile 2006
Dott.ssa Daniela Cilloni
“Terapie molecolari nelle malattie mieloproliferative”

4 maggio 2006
Dott. Luciano Mutti
“l mesotelioma:un modello di terapia traslazionale”

18 Maggio 2006
Prof. Marco Lenzi
“L’epatite autoimmune”

30 Maggio 2006
Prof. MariaLuisa Lavitrano
“Sperm mediated Gene Transfer:storia e applicazioni”

15 Giugno 2006
Prof. Guido Tarone
Melusin: a stretch sensor molecule controllino adaptive cardiac remodeling to pressure overload.

27 Giugno 2006
Prof.Lia Remondini
“Osteointegrazione e superfici implantari”

5 luglio 2006.
Dott.ssa Renata Grifantini
DNA and protein arrays in infection diseases: from basic research to vaccine design.

11 settembre 2006
Dr Prof. Dieter Brömme
“The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis”

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI INTERNAZIONALI:

16thEuropean Congress of Immunology; PARIS, 6-9- September 2006.

PUBBLICAZIONI OTTENUTE

Rita Clementi, Annalisa Chiocchetti, **Giuseppe Cappellano**, Elisa Cerutti, Massimo Ferretti, Elisabetta Orilieri, Irma Dianzani, Marina Ferrarini, Marco Bregni, Cesare Danesino, Valeria Bozzi, Maria Caterina Putti, Franco Cerutti, Angela Cometa, Franco Locatelli, Rita Maccario, Ugo Ramenghi, and Umberto Dianzani. VARIATIONS OF THE PERFORIN GENE IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNITY/LYMPHOPROLIFERATION AND DEFECTIVE FAS FUNCTION. Blood.(In press).

ABSTRACT A CONGRESSI

VARIATIONS OF THE PERFORIN GENE IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNITY/LYMPHOPROLIFERATION AND DEFECTIVE FAS FUNCTION.

Cappellano G., Chiocchetti A., Cerutti E., Ferretti M., Orilieri E., Dianzani I., Ramenghi U., Dianzani U. 16thEuropean Congress of Immunology; PARIS, France 6-9- September 2006 (POSTER).

VARIAZIONI NEL GENE DI PERFORINA IN PAZIENTI CON SCLEROSI MULTIPLA.

Orilieri E., **Cappellano G.**, Comi C., Chiocchetti A., Cerutti E., Castelli L., Monaco F., Dianzani U. PAVIA, 19-22 Settembre 2006. XXVIII Congresso Nazionale SIP 2006 Società Italiana di Patologia

DEFECTIVE FAS FUNCTION AND VARIATION OF PERFORIN GENE IN A PATIENT WITH EPIDERMODYSPLASIA VERRUCIFORMIS.

Tiberio R., Petrusi G., **Cappellano G.**, Azzimanti B., Mondini M., Dell'Oste V., Colombo E, Dianzani U, Gariglio M and Leigh G. 36th Annual European Society for Dermatological Research Meeting. PARIS, France 7-9 September 2006.