

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



**Analisi del gene H4/ICOS nei
pazienti con Sclerosi Multipla**

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

**Relazione IV anno
Candidato: Castelli Luca**

INTRODUZIONE

H4/ICOS

Il gene e la molecola

H4 è una molecola originariamente identificata nel nostro laboratorio ed espressa in membrana dai linfociti T umani e murini attivati (1-2). Successivamente è stato descritto il clonaggio di una molecola espressa selettivamente dai linfociti T attivati e correlata strutturalmente e funzionalmente a CD28 denominata ICOS (Inducible T cell Costimulator) (3). Il nostro laboratorio ha dimostrato che H4 e ICOS sono in realtà la stessa molecola (4).

Il gene che codifica per ICOS è approssimativamente lungo 25 kb e mappa nella regione cromosomica 2q33 insieme ai geni per CD28 e CTLA-4; questi tre geni sono funzionalmente correlati e appartengono alla famiglia molecolare di CD28 con il quale ICOS ha un'identità di sequenza aminoacidica di circa il 19% nel topo e di circa il 24% nell'uomo e una similarità di sequenza di circa il 39% nell'uomo (3). Il gene ICOS è polimorfico, è costituito da 5 esoni e 4 introni, si estende per una regione di circa 24 kb. Gli esoni 1, 2 e 3 codificano rispettivamente per la sequenza leader, il dominio extracellulare e il dominio transmembrana, mentre gli esoni 4 e 5 codificano per il dominio intracellulare (27).

La proteina ICOS è una molecola transmembrana di tipo I costituita da 199 aminoacidi ed espressa sotto forma di monomero oppure di omodimero; la forma dimerica ha un peso molecolare di circa 55-60 kDa mentre ogni singola catena pesa circa 27-29 kDa (3).

ICOS nell'attivazione dei linfociti T

I linfociti T rappresentano un importante componente cellulare del sistema immunitario e sono caratterizzati dall'espressione in membrana del TCR (T Cell Receptor) e dei corecettori CD4 o CD8. Il TCR rappresenta il recettore per l'antigene dei linfociti T maturi ed è costituito dall'associazione di 2 catene polipeptidiche denominate α e β (o meno frequentemente γ e δ) unite tra loro da ponti disolfuro. Le code intracellulari delle due catene del TCR sono troppo corte per poter svolgere la funzione di trasduzione del segnale; questa funzione viene infatti svolta da un complesso molecolare transmembrana associato al TCR, definito complesso del CD3, e costituito dalle catene ζ , η , ξ , θ . Il TCR non riconosce l'antigene libero in soluzione, ma solo legato a particolari molecole denominate MHC (Major Histocompatibility Complex); le molecole MHC sono espresse in membrana da cellule che hanno la funzione di presentare l'antigene ai linfociti T definite APC (Antigen Presenting Cell). Le cellule APC professionali sono rappresentate da linfociti B, cellule dendritiche e macrofagi ed esprimono costitutivamente molecole MHC, ma esistono altri tipi

cellulari che possono essere indotte ad esprimere molecole MHC, e quindi a funzionare da cellule APC, in seguito a stimoli infiammatori di varia natura, per es. cellule epiteliali, endoteliali., etc. Le molecole MHC sono poligeniche ed estremamente polimorfiche, due fenomeni comprensibili dato che una singola molecola MHC lega specificamente un singolo antigene, quindi maggiore è il numero di MHC differenti e maggiore sarà il numero di diversi antigeni che potranno essere legati e presentati ai linfociti T. Inoltre le molecole MHC si distinguono in base al tipo di antigene che legano e riconoscono:

- Le molecole di classe I legano peptidi che derivano da proteine citosoliche e sono riconosciute dai corecettori CD8 espressi sulla membrana del linfocita T. Queste proteine derivano dalla degradazione di virus e batteri intracellulari. Inoltre le molecole MHC di classe I possono essere espresse dalla maggior parte delle cellule.
- Le molecole di classe II legano peptidi che derivano da proteine extracellulari endocitate e degradate all'interno di appositi organuli intracellulari e sono riconosciute dai corecettori CD4 espressi sulla membrana dei linfociti T. Le molecole di classe II, contrariamente a quelle di classe I, sono espresse solo dalle APC professionali.

I corecettori CD4 e CD8 favoriscono il contatto tra cellule T e cellule APC grazie al loro legame con regioni non polimorfiche delle molecole MHC. I corecettori hanno inoltre due altre importanti funzioni:

- la prima è quella di partecipare agli eventi precoci della trasduzione del segnale che si verifica in seguito al riconoscimento del complesso antigene-MHC da parte del linfocita T; questa funzione è resa possibile dall'associazione della tirosina-kinasi lck con le code citoplasmatiche dei corecettori.
- la seconda è quella di essere responsabile del fenomeno della restrizione per MHC in virtù del riconoscimento specifico che si ha tra CD4 e i complessi antigene-MHC II e tra CD8 e i complessi antigene-MHC I.

Dopo l'attivazione, i linfociti T possono differenziarsi in due sottopopolazioni funzionalmente distinte (Th1 e Th2), caratterizzate dalla produzione di uno spettro di citochine diverso; la popolazione Th1 produce molecole quali INF- γ , IL-2 e TNF α , media una risposta infiammatoria verso cellule infettate da virus o batteri intracellulari ed è importante in varie patologie autoimmuni organo specifiche come per esempio il diabete mellito di tipo I, la sclerosi multipla e l'artrite reumatoide, mentre la popolazione Th2 produce molecole quali IL-4, 5, 9, 10, 13, media le reazioni immunitarie di tipo umorale verso patogeni extracellulari ed intestinali, inoltre è coinvolta nelle reazioni allergiche grazie all'effetto che ha sulla produzione di IgE da parte dei linfociti B (9).

L'attivazione dei linfociti T richiede due distinti segnali, uno costituito dal legame del complesso MHC-antigene espresso dalle cellule APC con il TCR del linfocita T, l'altro costituito dal legame delle molecole costimolatorie espresse sulla superficie delle cellule APC con specifici recettori espressi dai linfociti T. Il ruolo delle molecole costimolatorie è essenziale in quanto il segnale numero uno (legame del complesso MHC-antigene con il TCR del linfocita T) in assenza del segnale numero due (costimolazione) non attiva i linfociti T ma induce uno stato di anergia clonale o morte cellulare del linfocita per apoptosi. (5). La corretta definizione di molecola costimolatoria è quella di un recettore di membrana che non è in grado di attivare di per sé un linfocita T, ma piuttosto di potenziare o inibire il segnale attivatorio originatosi dal complesso del TCR (53). Recettori di membrana che sono coinvolti nell'adesione dei linfociti T ma non nella modulazione del segnale del TCR non sono considerati costimolatori (53). La maggioranza delle molecole costimolatorie appartengono alla superfamiglia di CD28/B7 o a quella del TNF/TNFR. Alcuni sono espressi costitutivamente ed hanno solo funzione stimolatoria, altri sono invece esposti in membrana in seguito all'attivazione cellulare indotta dalla stimolazione antigenica, e possono avere effetto stimolatorio o inibitorio. La molecola costimolatoria per eccellenza è CD28, espresso costitutivamente dai linfociti T ed in grado di legare le molecole B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) espresse basalmente dalle cellule APC attivate (6). Il segnale mediato da CD28 sinergizza con quello trasmesso dall'attivazione del TCR e induce una serie di modificazioni cellulari tra cui la trascrizione di IL-2 e l'espressione della catena α del recettore per IL-2 (CD25) che determina attivazione, espansione clonale e induzione delle fasi effettrici del linfocita. (7). Della stessa famiglia di CD28 fa parte anche CTLA-4, una molecola costimolatoria espressa sulla membrana del linfocita T in seguito all'attivazione e che regola negativamente l'attivazione linfocitaria competendo con CD28 per gli stessi ligandi (B7.1 e B7.2) (5).

ICOS rappresenta il terzo membro della famiglia di CD28 e contrariamente a CD28 è espresso solo in seguito all'attivazione. La costitutiva espressione di CD28 suggerisce che sia essenziale nelle fasi iniziali dell'attivazione linfocitaria, mentre la natura inducibile di ICOS sembra renderlo importante nelle fasi secondarie dell'attivazione. Inoltre sembra che tra le due molecole ci sia un rapporto di tipo gerarchico, in particolare che il costimolo di CD28 potenzi notevolmente l'espressione di ICOS (53). Questa dipendenza sembra non essere assoluta, infatti ICOS può essere indotto anche in assenza di CD28, sebbene in minor misura (54). La sua espressione è ristretta ai linfociti T, in particolar modo ai CD4⁺ ed è rapidamente indotto nelle prime fasi della differenziazione su entrambe le sottopopolazioni linfocitarie Th1 e Th2; successivamente, la sua espressione rimane alta solo nella sottopopolazione Th2 (8). L'attivazione di ICOS avviene tramite interazione con il suo ligando GL50 (B7h o B7RP1) espresso costitutivamente da certe APC come cellule B e

macrofagi; ICOS non interagisce con i ligandi B7.1 e B7.2 di CD28/CTLA-4. Diversamente da quanto accade per i ligandi di CD28 e di CTLA 4, i cui ligandi sono espressi solo a livello delle APC professionali, il ligando di ICOS può essere espresso anche da tessuti non linfoidi in seguito a stimoli di natura infiammatoria, come per esempio dalle cellule endoteliali, epiteliali e dai fibroblasti (10). Questo dato sembra subito indicare una sostanziale e fondamentale differenza tra il costimolo negli organi linfoidi centrali, mediato dall'interazione di CD28/CTLA-4 con i rispettivi ligandi sulle APC professionali, e quello invece a livello periferico, mediato dall'interazione di ICOS con il suo ligando (e da altri costimolatori) (53). L'importanza della costimolazione periferica è particolarmente evidente se si pensa a quanto succede a livello endoteliale, dove la presenza dei rispettivi ligandi potrebbe influenzare la capacità delle cellule effettrici T di invadere altri tessuti. Il locale rilascio di citochine da parte dei linfociti T effettori costimolati dai loro rispettivi ligandi espressi dalle cellule endoteliali potrebbe favorirne il passaggio tessuto/sangue. (53). In passato, gli studi erano incentrati sulla costimolazione dei linfociti T ad opera delle APC professionali a livello degli organi linfoidi centrali. Dopo la scoperta dell'espressione dei ligandi dei costimolatori anche a livello periferico, si è cominciato a porsi il quesito di come gli antigeni fossero presentati ai linfociti T a livello periferico. E' probabile che la costimolazione dei linfociti T naive differisce sostanzialmente da quella dei linfociti T che hanno già incontrato l'antigene, questo sia a livello centrale che periferico, oppure che CD28/CTLA-4 hanno una notevole importanza per quel che concerne l'attivazione dei linfociti T naive e memoria a livello degli organi linfoidi centrali, mentre ICOS e altri costimolatori sembrano preponderanti a livello periferico. Il vecchio modello a "due segnali" inerente l'attivazione dei linfociti T sottostima il ruolo di altri elementi, ed è probabile che venga riconsiderato come un "multisegnale" che prevede il coinvolgimento di altre molecole (53). Contrariamente ad altri membri della famiglia di CD28, l'interazione ICOS-ICOSL sembra essere esclusiva, dal momento che esperimenti di Knock Out (KO) di ICOS o di ICOSL sul topo presentano un fenotipo simile (11). L'interazioni di ICOS con il suo ligando, come anche quella di CD28 con il suo, determina anche un aumento dell'espressione di CD40L sulla superficie del linfocita T, la cui interazione con il suo recettore CD40 espresso costitutivamente su tutte le APC professionali, potenzia, a sua volta, l'espressione di B7.1/2 e di ICOS-L, amplificando il segnale dello stesso ICOS e di CD28 (3). La costimolazione mediata da ICOS induce la produzione di un'ampia gamma di citochine, fatta eccezione che per la IL-2 e IL-9 (3, 52). Infatti, a differenza di CD28, la cui attivazione induce la sintesi di alti livelli di IL-2, l'attivazione di ICOS nel topo sembra invece indurre la sintesi IL-4. Livelli di IL-2 incapaci di sostenere una risposta immunitaria completa ma in grado solo di indurre le fasi iniziali della proliferazione sembrano essere rilevati in seguito all'attivazione di ICOS in un lavoro di Riley e coll. (12). Probabilmente la costimolazione

di CD28, grazie alla sua capacità di indurre la sintesi di IL-2, è importante nelle fasi iniziali dell'attivazione, mentre la costimolazione di ICOS sembra essere importante nell'attivazione secondaria o nell'attivazione delle cellule memoria (13). Le cellule T attivate mediante costimolazione con ICOS sono incapaci di proliferare a lungo termine e vanno incontro ad apoptosi dopo circa 3-5 divisioni cellulari (12). La costimolazione selettiva di ICOS al posto di CD28 a livello periferico conferirebbe funzioni effettrici alle cellule T senza tuttavia indurre attivazione e proliferazione a lungo termine (dovuta alla mancanza di IL-2), riducendo quindi il rischio di insorgenza di reazioni autoimmuni. (12, 46). Questa ipotesi è supportata dal fatto che l'espressione di ICOS è aumentata nelle cellule T effettrici (14) e che le funzioni effettrici delle cellule T sono stimulate dalla costimolazione con ICOS (15, 46). La costimolazione con ICOS potrebbe quindi essere un meccanismo per attivare rapidamente le cellule memoria e le funzioni effettrici senza indurre un'espansione clonale che potrebbe favorire lo sviluppo di reazioni autoimmuni (16, 46).

Evidenze sperimentali dimostrano che topi knock out per ICOS e per CD28 mostrano difetti simili ma non uguali nella risposta cellulare di tipo B mediata da cellule T, suggerendo che l'effetto biologico delle due molecole costimolatorie nella maturazione dei linfociti B non sia ridondante (17). Una possibilità è che per avere un'ottimale e completa attivazione dei linfociti T sia necessaria la costimolazione da parte di entrambe le molecole in vivo. Diversamente, potrebbe essere che ICOS e CD28 agiscano in momenti diversi dell'attivazione T. Basandosi sui dati inerenti i tempi d'espressione dei due recettori e dei loro ligandi, sembra che CD28 sia importante nelle fasi iniziali dell'attivazione mentre ICOS nel mantenimento delle funzioni effettrici delle cellule T e quindi anche nell'indurre una risposta immunitaria da parte delle cellule B (produzione di citochine ed espressione di CD40L) (18).

Dati ottenuti sui topi KO per ICOS (47) e per il suo ligando B7-h (48), indicano che le loro funzioni sono, apparentemente, dipendenti uno dall'altro, avvalorando i dati ottenuti finora che vedono B7-h come l'unico ligando per ICOS. Il KO per ICOS mostra una diminuita proliferazione e produzione di IL-2 suggerendo che sia coinvolto nell'attivazione e nella differenziazione dei linfociti T, mentre il deficit nella risposta di tipo umorale e nello sviluppo dei centri germinativi accompagnando ad una marcata riduzione nella produzione di IL-4 sottolineano invece il ruolo di ICOS nelle funzioni effettrici dei linfociti T, in particolare nelle fasi finali della maturazione dei linfociti B, che avviene proprio a livello dei centri germinativi. In modo analogo, topi KO per B7-h indicano che B7-h è necessario per un'adeguata attivazione e differenziazione dei linfociti T e per l'espressione di citochine effettrici.

Riguardo al ruolo di ICOS nella differenziazione dei linfociti T in Th1 e Th2, dai topi KO per ICOS emergono dati interessanti che fanno pensare ad un suo coinvolgimento nella regolazione sia

delle risposte Th1 che Th2. Nurieva et al., hanno dimostrato che ICOS regola la differenziazione Th2, in particolare l'espressione della citochina IL-4, attraverso un meccanismo cMaf / NFATc1-dipendente, nel senso che ICOS favorisce l'espressione del fattore di trascrizione NFATc1 e che questo, a sua volta, induce l'espressione di cMaf, un potente fattore di trascrizione di IL-4 (49). Un altro lavoro ha invece dimostrato che l'effetto della costimolazione mediata da ICOS sulla differenziazione Th2 non si ottiene attraverso un incremento della produzione di IL-4, ma attraverso un aumento della sensibilità del recettore per IL-4 (55). Questo comporta comunque un aumento della via di trasduzione del segnale dell'IL-4, che a sua volta induce la fosforilazione di stat6 e del fattore di trascrizione dell'IL-4 denominato GATA-3. Confrontando i dati visti finora e quelli di altri ricercatori, sembra che la costimolazione mediata da ICOS comporti un aumento del numero di cellule che producono IL-4, ma non la loro capacità di produrre la citochina (55). Il motivo di queste discrepanze nei dati potrebbe essere dovuto a differenze nei modelli di lavoro sperimentali. D'altro canto, sembra che ICOS sia coinvolto anche nella regolazione delle risposte di tipo Th1. Infatti, topi KO per ICOS mostrano una completa resistenza allo sviluppo dell'artrite indotta da collagene (CIA), il modello murino dell'artrite reumatoide (AR). Il meccanismo molecolare responsabile di questa associazione sembra essere la ridotta produzione di IL-17, la cui azione proinfiammatoria a livello delle giunzioni articolari induce un processo distruttivo che favorisce la patogenesi dell'artrite reumatoide (50). Contrariamente a quanto osservato per la AR, i topi KO per ICOS sono invece molto più sensibili allo sviluppo dell'encefalite autoimmune sperimentale (EAE), il modello murino della sclerosi multipla (MS), probabilmente perchè viene meno il suo effetto sulla produzione delle citochine di tipo Th2 (vedere sezione ICOS e Sclerosi Multipla). Queste due patologie, la Sclerosi Multipla e l'Artrite Reumatoide, sono considerate mediate da una risposta Th1, ed ICOS sembra essere importante nella patogenesi di entrambe, sebbene agisca con meccanismi sostanzialmente diversi. Ancora, dati ottenuti da Wassink et al. mostrano che l'espressione di ICOS sui linfociti Th umani attivati è stimolata dall'IL-12 e IL-23, e non dall'IL-4 come dimostrato precedentemente sul topo (56). Di conseguenza, i linfociti Th1 indotti dall'IL-12 e IL-23 mostrano livelli maggiori di ICOS rispetto ai linfociti Th2 indotti invece dall'IL-4. Inoltre i livelli di espressione di ICOS non sono una caratteristica stabile di una particolare sottopopolazione di Th, ma dipendono dalla concentrazione e dall'ambiente citochinico ad ogni stimolazione. Infatti, l'effetto stimolatorio sulla produzione di ICOS delle due citochine si rileva sia sui linfociti Th1 che Th2, indicando che i livelli di espressione di ICOS non sono stabilmente imposti dalla differenziazione dei linfociti nelle due sottopopolazioni Th1 e Th2. (56). Contrariamente ai dati ottenuti sui topi, IL-4 ha invece un effetto inibitorio sull'espressione di ICOS indotta da IL-12 e IL-23. Si è anche dimostrato che la regolazione dell'espressione di ICOS mediata da IL-12 e IL-23 ha

un effetto sulle funzioni effettrici dei linfociti stessi, in particolare sulla produzione di citochine. Ad un maggior livello di espressione di ICOS corrisponde una aumentata produzione di citochine, sia per i linfociti Th1 che per i Th2 (56). Questa regolazione dell'espressione di ICOS ad opera dell'ambiente citochinico locale, potrebbe essere un metodo per regolare quantitativamente la risposta dei linfociti T effettori, soprattutto a livello periferico.

L'impiego dei topi KO per ICOS e B7h ha chiarito molti aspetti inerenti il ruolo biologico di ICOS, in particolare ne ha evidenziato il ruolo regolatorio nella risposta immunitaria (attivazione, differenziazione e funzioni effettrici dei linfociti Th) e nella patogenesi delle malattie autoimmuni (51). E' altresì probabile che ICOS non sia direttamente coinvolto nella differenziazione Th1/2 e quindi nella conseguente produzione delle rispettive citochine, ma probabilmente nella produzione di un particolare set di citochine nel momento e nelle sedi opportune (51, 53). Esistono infatti sufficienti dati scientifici per supporre che l'espressione di ICOS aumenti parallelamente al grado di differenziazione dei linfociti T CD4+, producendo citochine diverse a seconda del suo grado di espressione (53). Questo modello è compatibile con la sindrome da mancata espressione di ICOS nell'uomo, in cui non viene influenzato in maniera inequivocabile il programma di differenziamento citochinico (53). In base a quanto detto, la biodisponibilità e la densità del ligando di ICOS influenzerebbe la produzione di un diverso set di citochine; alti livelli di ICOSL indurrebbero l'espressione di citochine da parte di tutte le cellule che esprimono ICOS, al contrario, bassi livelli di ICOSL indurrebbero l'espressione di citochine solo da parte delle cellule che esprimono alti livelli di ICOS (53).

ICOS E LE MALATTIE AUTOIMMUNI

Le malattie autoimmuni rappresentano l'errore più grande che il sistema immunitario possa compiere. Il sistema immunitario è quel sistema biologico costituito da cellule (ad es. linfociti, macrofagi...) e da molecole (ad es. citochine) che ha lo scopo di difendere il nostro organismo dalla comparsa di malattie dovute ad agenti infettivi patogeni quali virus, batteri, funghi etc..., e dai tumori. Una delle caratteristiche di questo sistema è la capacità di discriminare tra antigeni *self* e *not-self*, garantendo la risposta immunitaria solo contro sostanze estranee all'organismo e la tolleranza verso gli antigeni autologhi (fenomeno noto come tolleranza al *self*). La perdita di suddetta tolleranza si traduce in risposte immuni verso i propri costituenti antigenici, dando origine a malattie autoimmuni. Altra caratteristica del sistema immunitario è la capacità di autolimitarsi: quando le cellule del sistema immunitario si attivano si ha l'espressione di particolari geni coinvolti nella proliferazione e nelle funzioni effettrici dei linfociti, ma contemporaneamente si induce anche l'espressione dei geni che determinano l'apoptosi della maggior parte dei linfociti attivati, fenomeno noto come "spegnimento della risposta immunitaria". L'attivazione dei linfociti serve infatti a eliminare l'antigene e una volta realizzato il loro scopo essi sono destinati ad andare incontro ad apoptosi. Una piccola porzione di essi non muore e permane come cellule memoria, importanti nelle successive stimolazioni da parte dello stesso antigene. L'attivazione dei linfociti a cellule effettrici è antigene specifica e deve essere quindi limitata nel tempo: dopo che l'antigene è stato eliminato, i linfociti devono andare incontro a morte cellulare programmata o apoptosi. Lo spegnimento della risposta immunitaria è essenziale per garantire protezione nei confronti dell'autoimmunità: se i linfociti non vanno in apoptosi dopo che gli antigeni *not-self* sono stati eliminati, c'è il rischio che riconoscano per errore antigeni *self*. La teoria del mimetismo molecolare spiega infatti che molte proteine virali hanno determinanti antigenici simili a quelli di proteine autologhe: se i linfociti non vanno incontro ad apoptosi e rimangono attivi dopo che gli antigeni estranei sono stati eliminati possono riconoscere per errore epitopi autologhi e scatenare una reazione autoimmune. Un difetto di apoptosi può favorire una risposta autoimmune in differenti modi. Primo, le cellule apoptotiche esprimono in membrana autoantigeni inusuali per una cellula normale, e il rallentamento della morte cellulare rende questi antigeni *self* più esposti nel tempo (19). Secondo, alterazioni del processo apoptotico possono scatenare fenomeni necrotici che, a differenza dell'apoptosi, determinano la comparsa di reazioni infiammatorie che favoriscono la presentazione di antigeni autologhi al sistema immunitario. Verosimilmente, autoanticorpi associati a malattie autoimmuni riconoscono epitopi che si generano durante la degradazione apoptotica di proteine e DNA (20) o specifici fosfolipidi quali fosfatidilserina e cardiolipina, espressi sulla superficie delle cellule apoptotiche (21). L'apoptosi può essere indotta passivamente in seguito all'assenza di segnali di sopravvivenza (22) o attivamente tramite il coinvolgimento di recettori

cosiddetti di morte (23). I più noti recettori di questo tipo sono quelli appartenenti alla superfamiglia dei Recettori dei Fattori di Necrosi Tumorale (TNFR), che interagiscono con molecole appartenenti alla superfamiglia dei Fattori di Necrosi Tumorale (TNF). Il più noto di questi recettori è Fas (Apo-1/CD95), il cui meccanismo d'azione si attua attraverso l'attivazione a catena di una serie di proteasi definite caspasi (*cysteine-dependent aspartate-directed proteases*) (24).

Dal punto di vista clinico si dividono in sistemiche come ad es. la Sindrome Autoimmune LinfoProliferativa (ALPS) e il Lupus Eritematoso Sistemico (LES), e organo-specifiche come ad es. il diabete mellito di tipo1 (T1DM), la sclerosi multipla (MS) e la tiroidite di Hashimoto (HT); dal punto di vista invece del meccanismo immuno-patogenetico si distinguono in malattie mediate da anticorpi, che danno origine a danni tipicamente sistemici, e mediate da linfociti, che invece determinano un danno prevalentemente organo o tessuto-specifico.

L'autoimmunità rappresenta un problema abbastanza comune e sempre più crescente nella popolazione, basti pensare che la frequenza stimata nei paesi sviluppati è di circa il 5%. Queste patologie sono multifattoriali, sono quindi causate dalla combinazione di fattori genetici e di fattori ambientali che agiscono su quello che è il background genetico di un individuo influenzando il rischio genetico che ognuno di noi ha di sviluppare una data patologia. Una adeguata conoscenza dei geni e dei meccanismi coinvolti nell'autoimmunità permetterebbe di sviluppare adeguate terapie e adeguati piani di prevenzione. Le modificazioni del genoma umano che alterano i meccanismi fisiologici coinvolti nella suscettibilità all'autoimmunità sono per definizione fattori di rischio causali primari. Di qui l'importanza di studi di genetica posizionale per identificare i geni e le loro varianti che conferiscono predisposizione a determinate malattie autoimmuni.

La regione cromosomica 2q33 è stata associata in molti studi a malattie autoimmuni comuni quali le tiroiditi, la sclerosi multipla, il diabete mellito e a malattie immuno mediate quali il morbo celiaco. Di questa regione fanno parte tre geni importanti nella regolazione dell'attivazione dei linfociti T: CTLA-4, CD28 e ICOS.

La maggior parte degli studi genetici sulle molecole della regione 2q33 riguarda l'associazione di CTLA-4 con diverse patologie autoimmuni quali il diabete mellito, la malattia di Graves, la malattia di Hashimoto, la Miastenia gravis (25, 26, 27, 28). Topi KO per CTLA-4 sviluppano una forma di autoimmunità letale precoce (29). L'inibizione di CTLA-4 mediante anticorpi in topi con EAE all'esordio clinico (la forma analoga della sclerosi multipla nel topo) determina un peggioramento della malattia e un aumento della mortalità (30, 31), mentre il trattamento con anticorpi agonisti di CTLA-4 previene la comparsa della malattia e ne migliora il quadro clinico (32, 33). CTLA-4 ha un ruolo inibitorio nell'attivazione dei linfociti e controbilancia l'effetto attivatorio di CD28; mutazioni

o polimorfismi che diminuiscono l'espressione e/o l'attività di CTLA-4 (o che aumentano l'espressione e/o attività di CD28) possono rappresentare un fattore di rischio genetico che predispone alle malattie autoimmuni.

Recentemente sono stati pubblicati diversi lavori inerenti il coinvolgimento di ICOS nelle malattie autoimmuni, sia dal punto di vista genetico che funzionale. La Miastenia Gravis (MG) è una patologia autoimmune caratterizzata da debolezza e fatica muscolare dovuta ad una difettiva trasmissione neuromuscolare causata da autoanticorpi diretti verso i recettori nicotinici dell'acetilcolina. Esperimenti condotti sui topi KO per ICOS, mostrano una marcata resistenza allo sviluppo della Miastenia Gravis Autoimmune Sperimentale (EAMG), il modello murino della malattia, suggerendo un suo coinvolgimento nell'induzione della malattia. La ragione principale di questa resistenza sembra essere una sostanziale diminuzione nello scambio isotipico e nella produzione di autoanticorpi verso il recettore dell'acetilcolina (57). In questo lavoro si dimostra che il costimolo mediato da ICOS è importante per un corretto sviluppo dei centri germinativi (GC), il luogo in cui i linfociti T aiutano i linfociti B a maturare e ad andare incontro allo scambio isotipico e ai fenomeni di ipermutazione somatica delle regioni variabili delle immunoglobuline. Inoltre si dimostra che, durante la risposta immunitaria verso i recettori dell'acetilcolina, il deficit nello scambio isotipico dovuto alla mancanza di ICOS influenza la differenziazione dei linfociti B e la produzione di anticorpi da parte dei linfociti B associati sia ai linfociti Th1 che ai Th2 (57). Questo è un dato a favore di un coinvolgimento di ICOS nelle risposte sia Th1 che Th2. Dati iniziali dimostrarono che ICOS promuoveva le risposte di tipo Th2 in virtù del suo effetto positivo sul rilascio di IL-4 e IL-10 e dati iniziali prodotti sui topi KO che manifestavano un marcato deficit a carico delle citochine di tipo Th2. Tuttavia è ormai accettato che ICOS sia egualmente importante nel mediare anche le risposte proinfiammatorie di tipo Th1 (TNF- α , INF-gamma, IL-6). Nel lavoro di Benjamin et al., si dimostra che l'assenza di ICOS durante la risposta immunitaria ai recettori dell'acetilcolina comporta un'aumentata resistenza all'induzione dell'EAMG e un difetto nella produzione delle citochine di tipo Th1 e Th2, comprese IL-10 e INF-gamma (57). Entrambi i tipi di citochine sono indispensabili per lo sviluppo dell'EAGM, e ICOS sembra essere un importante punto di controllo per la differenziazione dei linfociti nelle due sottopopolazioni durante lo sviluppo dell'EAGM.

ICOS è importante anche nello sviluppo della miocardite acuta, una patologia mortale caratterizzata da una cardiomiopatia di probabile origine autoimmune. In particolare, studi condotti sui topi immunizzati per indurre la miocardite autoimmune sperimentale (EAM), mostrano come il blocco della via di ICOS durante la fase effettiva della risposta immunitaria attenui lo sviluppo della

malattia. Inoltre il blocco di ICOS inibisce la proliferazione indotta dall'antigene e la produzione di citochine quali IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IL-1 β , INF-gamma (58).

Il ruolo di ICOS è stato studiato anche nell'Artrite Reumatoide (AR) tramite l'impiego dei modelli animali con Artrite Indotta da Collagene (CIA). Si è scoperto che i topi KO per ICOS e con un particolare background genetico erano completamente resistenti all'induzione della CIA, probabilmente grazie alla ridotta produzione ICOS-mediata della citochina proinfiammatoria IL-17, il cui effetto deleterio a livello delle cartilagini articolari viene appunto a mancare (59). Oltre ai dati ottenuti sul topo, ci sono anche evidenze nell'uomo che suggeriscono come ICOS possa essere coinvolto nell'immunopatogenesi della AR influenzando la risposta immunitaria a livello delle articolazioni nei pazienti (61). In particolare, si è evidenziato un aumento dell'espressione di ICOS nei linfociti T CD4 e CD8 del liquido sinoviale dei pazienti con AR rispetto ai linfociti T del sangue periferico degli stessi, e un aumento di espressione nei linfociti T CD8 dei pazienti rispetto ai linfociti T CD8 dei controlli. Inoltre, il costimolo mediato da ICOS è chiaramente associato con la produzione di INF-gamma, IL-4 e IL-10 da parte dei linfociti T CD4 del liquido sinoviale (61).

Il Lupus Eritematoso Sistemico è una patologia autoimmune sistemica, che coinvolge il sistema ematopoietico e molti organi periferici quali i reni, la pelle, il sistema nervoso centrale e caratterizzata da una iperattivazione della componente umorale del sistema immunitario che porta alla produzione e al deposito di autoanticorpi a livello degli organi sopra menzionati. Elevati livelli di espressione di ICOS sono stati riscontrati sui linfociti CD4 e CD8 nei pazienti con Lupus Eritematoso Sistemico (LES), insieme ad una ridotta espressione di L-ICOS sui linfociti B del circolo periferico. Inoltre, si è dimostrata l'esistenza di aggregati di linfociti B, plasmacellule e linfociti T a livello dei reni dei pazienti con LES (60). Una diminuita espressione di L-ICOS potrebbe essere dovuta ad una recente interazione con il suo recettore ICOS, e un'aumentata interazione ICOS-ICOSL può portare ad una iperattivazione della componente umorale della risposta immunitaria tipica del LES. Da quanto detto, ICOS potrebbe essere coinvolto nell'immunopatogenesi della malattia (60). Yang JH. et al., hanno evidenziato una iperespressione di ICOS sui linfociti T CD4 e CD8 del sangue periferico dei pazienti con LES rispetto ai pazienti con AR e ai controlli sani (62). Inoltre l'attivazione dei linfociti T da sangue periferico di pazienti con LES attivati con anti-CD3 e anti-ICOS ha mostrato un aumento dei livelli di IL-2 e un aumento nella produzione di anticorpi anti-dsDNA e di IgG totali rispetto ai controlli sani, suggerendo ancora una volta un suo ruolo nell'immunopatogenesi della malattia. Aumentati livelli di ICOS sui linfociti T CD4 e CD8 periferici, associati al decorso clinico della malattia e ai livelli sierici di immunoglobuline e di anticorpi anti-dsDNA, sono stati rilevati anche da Zhonghua YX. et al. (63).

I microsatelliti dell'introne 4 di ICOS sono stati oggetto di indagine in studi di associazione con malattie autoimmuni quali il diabete mellito nella popolazione giapponese e le tiroiditi autoimmuni nella popolazione americana e hanno dato riscontro negativo (25, 26, 27). Recentemente uno studio finlandese ha pubblicato l'associazione tra alcuni polimorfismi di ICOS e il morbo celiaco (34).

ICOS E SCLEROSI MULTIPLA

I motivi che giustificano uno studio genetico di associazione tra ICOS e la sclerosi multipla sono i seguenti:

- il gene ICOS è localizzato in una regione cromosomica (2q33) associata a malattie autoimmuni comuni e a malattie immuno mediate (diabete mellito, sclerosi multipla, tiroiditi, morbo celiaco)
- ICOS è una molecola coinvolta nella regolazione dell'attivazione e del differenziamento dei linfociti T, eventi entrambi cruciali in una patologia autoimmune Th1 mediata come la sclerosi multipla
- esistono lavori che confermano l'importanza di ICOS nell'immunopatogenesi dell'EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, il modello murino della sclerosi multipla)

In seguito all'induzione dell'EAE in topi SJL con la proteina proteolipidica (PLP), ICOS e ICOSL vengono iperespressi dai linfociti T CD3+ che infiltrano il sistema nervoso centrale (SNC) prima della comparsa della malattia, suggerendo che ICOS abbia un ruolo nell'immunopatogenesi della malattia (35). L'impiego di anticorpi anti ICOS per inibire l'interazione con il suo ligando può avere un duplice effetto sul quadro clinico degli animali, a seconda del momento in cui l'inibizione avviene: se l'inibizione avviene nelle fasi iniziali (1-10 giorni dall'immunizzazione con PLP) si ha un peggioramento della malattia (aumento dell'espressione di citochine proinfiammatorie e chemochine nel SNC, aumento dell'infiltrazione di cellule B/T, macrofagi e neutrofili nel SNC), se invece avviene nelle fasi effettrici della risposta immunitaria (9-20 giorni dall'immunizzazione) si ha il recupero dalla malattia sia a livello clinico che cellulare e molecolare (35). E' probabile che il blocco della via costimolatoria di ICOS nelle fasi iniziali della risposta immunitaria determini un aumento decisivo del rapporto Th1/Th2 che causa una maggiore proliferazione dei linfociti T antigene specifici e una maggiore produzione di INF- γ . L'EAE è una malattia Th1-mediata e una polarizzazione verso un fenotipo Th1 determina un peggioramento della malattia. Questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti con il KO di ICOS sui topi EAE (36). L'aggravamento della malattia potrebbe essere dovuto al fatto che la polarizzazione verso un fenotipo Th1 scatenata dal blocco della costimolazione di ICOS induce una maggiore espressione di determinati mediatori (citochine e chemochine) nel cervello di questi animali. Tra questi mediatori potenzialmente pericolosi per l'EAE ricordiamo, oltre ovviamente INF- γ , anche CCR1, RANTES, MCP-1, MIP-2, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12p35 (35). Le interazioni CCR1-RANTES e CCR2-MCP1 hanno un ruolo importante nell'immunopatogenesi dell'EAE: CCR1 e CCR2 sono espresse da monociti/macrofagi e microglia e sono attivati in seguito al legame con RANTES e MCP1, molecole per altro iperespresse nei topi con EAE (topi ko per CCR1 presentano minore incidenza e gravità della malattia, topi ko per CCR2 sono protetti dallo sviluppo della malattia). E' quindi verosimile che

un'aumentata attivazione di monociti/macrofagi e microglia dovuta ad una maggiore espressione di queste chemochine (RANTES e MCP1) determini l'aggravamento della malattia che si osserva nei topi (35). MIP2 è un fattore chemotattico per i neutrofili nel topo e infatti si osserva un aumento del numero di neutrofili nelle lesioni del cervello dei topi con EAE, dato in accordo con un aumento dell'espressione MIP2. La somministrazione di IL-1 α determina un aggravamento della malattia e la somministrazione di IL-1 β inibisce l'anergia delle cellule T nei topi con EAE (37). IL-6 ha un ruolo nell'EAE in quanto topi ko per IL-6 sono protetti dallo sviluppo della malattia.

Se l'inibizione della via costimolatoria di ICOS avviene nelle fasi effettrici della risposta immunitaria (9-20 giorni dall'immunizzazione con PLP) si ha la remissione clinica dalla malattia associata ad una minore proliferazione linfocitaria, espressione di INF- γ e di altre citochine/chemochine e infiltrazione di leucociti nel SNC. Simili risultati hanno ottenuto Sporic e coll dimostrando che bloccando la via costimolatoria di ICOS con anticorpi in topi con EAE già in corso si ottiene un miglioramento clinico (38). E' probabile che l'effetto e la funzione di ICOS cambino nel tempo man mano che la risposta immunitaria evolve; la capacità di indurre l'espressione sia di IL-10 che di INF- γ suggerisce che ICOS sia coinvolto nell'attivazione di cellule regolatorie e infiammatorie (38). Probabilmente il blocco della via di ICOS 9-20 giorni dall'immunizzazione ha un effetto positivo sulla malattia perchè esso agisce prevalentemente su cellule infiammatorie bloccandone l'attivazione.

Nell'EAE, i linfociti T antigene specifici (cioè PLP-specifici) che si trovano nelle lesioni del cervello sono meno del 4% e sono essenzialmente Th1 che agiscono reclutando altri leucociti non antigene specifici. Se si riuscisse ad inibire selettivamente l'attivazione di questa sottopopolazione di cellule T encefalolitogeniche probabilmente si inibirebbe anche il reclutamento non specifico di leucociti con risvolti positivi sulla malattia. Nel lavoro di Rottmann e coll., si è dimostrato che linfociti T ICOS $^{+}$ si trovano nelle lesioni del cervello dei topi EAE prima ancora che si manifesti la malattia e che, almeno in parte, questi linfociti sono PLP-specifici. E' probabile che bloccando la via costimolatoria di ICOS si inibisca l'attivazione e la proliferazione di queste cellule T encefalitogeniche e quindi il successivo reclutamento di leucociti non antigene specifici. Le cellule che nel SNC potrebbero esprimere ICOSL sono astrociti e microglia, dal momento che sono in grado di attuare una costimolazione Th1 e Th2 indipendentemente dall'espressione di B7.1/2 (35). L'importanza dell'interazione ICOS-ICOSL nella patogenesi dell'EAE è confermata anche nello studio di Sporic e coll., dove si dimostra che l'attivazione delle cellule T encefalitogeniche richiede l'attivazione della via costimolatoria di ICOS (38). Nel suddetto lavoro si dimostra anche che in cellule T provenienti da topi EAE e coltivate con ICOS Ig in vitro, l'interazione ICOS-ICOSL è fondamentale per la produzione di IL-10 e di INF- γ ma non di IL-2 ed è indipendente dalla

costimolazione di CD28 (38). Questi dati sono in accordo con la letteratura dove si è dimostrato che ICOS influenza la produzione di IL-10 e di INF- γ ma non di IL-2 come invece fa CD28 (3, 10). Un lavoro ha invece dimostrato il contrario, e cioè che bloccando la costimolazione mediata da ICOS si ha un effetto inibitorio sulla produzione di IL-2 (12). Se da una parte è vero che ICOSL induce la produzione di INF- γ nei topi, dall'altra è altrettanto vero che INF- γ induce a sua volta l'espressione di ICOSL attraverso un meccanismo NF-kB indipendente (INF- γ potenzia invece l'espressione delle molecole B7 attraverso un meccanismo NF-kB dipendente).

La costimolazione di ICOSL fornisce un segnale proliferativo anti-apoptotico alle cellule encefalitogeniche T nei topi EAE e il blocco di questa via induce apoptosi soprattutto nelle cellule memoria rispetto alle cellule naive. Questi dati rispecchiano le precedenti scoperte che CD28 protegge dall'apoptosi preferenzialmente le cellule naive rispetto alle cellule memoria, suggerendo che invece ICOS abbia proprio un ruolo sulla sopravvivenza delle cellule memoria (38).

Recenti esperimenti condotti su PBMCs umani (peripheral blood mononuclear cells) indicano che ICOS modula l'espressione sia di citochine Th1 che Th2 indipendentemente da CD28 nelle cellule T CD4+ memoria ed effettrici, ma che le cellule Th2 esprimono comunque più ICOS delle Th1 (39). E' possibile che ICOS abbia un ruolo nella modulazione della seconda fase della risposta immunitaria. A livello periferico molti tessuti di natura non linfoide possono esprimere molecole MHC di classe II e comportarsi quindi come molecole APC non professionali influenzando la risposta immunitaria delle cellule autoreattive. Proprio in questi tessuti che mancano delle molecole B7.1/2, il segnale mediato da ICOS potrebbe avere un ruolo decisivo, come recentemente dimostrato nel caso delle miopatie infiammatorie (40). Nella sclerosi multipla, la locale (ri)attivazione delle cellule T autoreattive nel SNC da parte delle cellule che esprimono i complessi MHC II-antigene è un evento fondamentale nell'indurre il danno autoimmune contro la guaina mielinica (41). Quanto detto assume particolare importanza se si pensa che le cellule T autoreattive nei pazienti con sclerosi multipla dipendono meno dalla costimolazione di CD28 rispetto alle cellule T dei soggetti sani (42) e inoltre che nei pazienti con sclerosi multipla esistono cellule T reattive alla mielina che sono CD4+ e CD28- e che sono (ri)attivate perifericamente o nel SNC in assenza delle molecole B7.1/2 (43).

Recentemente, un lavoro norvegese non ha evidenziato nessuna associazione con la sclerosi multipla analizzando sei microsatelliti e tre polimorfismi della regione 2q33 comprendente i geni CD28,CTLA-4 e ICOS (64). Tuttavia, esistono numerosi altri studi di associazione che riscontrano e confermano il ruolo di CTLA4 nella patogenesi della SM.

Da quanto detto emerge abbastanza chiaramente che ICOS ha un ruolo nell'immunopatogenesi della sclerosi multipla e di qui l'importanza di studiare il gene e la molecola sotto tutti i suoi aspetti.

ICOS: ANALISI DEL GENE

ICOS è codificato da un gene altamente polimorfico caratterizzato da siti regolatori, microsatelliti, mutazioni e SNPs (single nucleotide polymorphisms). In letteratura sono indicati 16 SNPs nella regione 5'UTR, 50 nelle regioni introniche, 47 nella regione 3'UTR, 4 nelle regioni codificanti. Di questi polimorfismi esonici, 2 sono stati trovati nell'esone 2 e sono le sostituzioni A/G e T/C (67, 68) entrambi silenti; 1 polimorfismo A/C nell'esone 3 che determina il rimpiazzo di una glutamina con una prolina (67); 1 polimorfismo A/C silente nell'esone 5. Alcuni di queste variazioni non sono state descritte in altri lavori oltre quelli in cui sono stati identificati, alcune sono molto rare o addirittura possono rappresentare mutazioni o errori di sequenza. I principali polimorfismi di ICOS, più volte citati nei lavori presenti in letteratura sono i seguenti: (26, 27, 34, 44, 45).

regione 5'UTR:

- 23 siti per regolatori trascrizionali (di cui 5 per Sp1, 5 per Pu1, 5 per STAT-1, 4 per GATA-3, 1 per NF-kB, 1 per AP-1, 1 per AP-2, 1 per NF-1)
- 8 SNPs: p-668 G/A, p-842 T/A, p-1388 G/A, p-1817 T/C, p-2119 C/T (SNP all'interno di un sito per NF-kB), p-2150 C/T, p-2394 T/C (SNP all'interno di un sito per Sp1), p-3479 C/T.

(la numerazione dei polimorfismi, se non indicato diversamente, fa riferimento a Genebank accession number AF488347)

sequenze codificanti (ESONI)

- mutazione silente in eterozigosi in posizione p4026 A/G (+597 A/G*) nell'ultimo codone dell'esone 5 (frequenza su controlli sani 1/220 cromosomi).

sequenze non codificanti (INTRONI)

- introne 1: +173 T/C*
- introne 3: cinque polimorfismi p1203 C/T, p1323 C/G (possibile enhancer), p1551 A/G, p1974 A/G, p2003 C/T
- introne 4: cinque polimorfismi p2412 A/T, p2658 C/T, p3168 C/A, p3396 G/T (sito di Sp1), p3990 G/T. Inserzione di una G e 2 microsatelliti: Tn vicino sito donatore di splicing e (GT)_n vicino sito accettore di splicing.

regione 3' UTR

- 10 polimorfismi: p4031 A/C (+602 A/C*), p4359 G/A (+930 G/A*), p4888 A/T (+1459 A/T*), p4993 T/C (+1564 T/C*), p5053 C/T (+1624 C/T*), p5291 A/G (+1862 A/G*), +1720 C/T*, p5436 G/A (+2007 G/A*), p5462 G/A (+2033 A/G*), p5802 G/C (+2373 G/C*).

**I polimorfismi al 3' UTR sono presenti in letteratura anche con la numerazione relativa al cDNA, +1 è la prima base del codone di inizio ATG.*

Lee et al., hanno condotto uno studio funzionale, conclusosi con esito negativo, per capire se il polimorfismo +602 A/C avesse un effetto sul legame con ICOS-L (66).

Le due regioni microsatelliti nell'introne 4 di ICOS, Tn e GTn sono state oggetto di indagine in uno studio di associazione giapponese sul diabete mellito senza aver dato tuttavia un riscontro di associazione con la malattia (27). Esito negativo ha anche ottenuto uno studio genetico sulla popolazione americana e le tiroiditi che ha preso in considerazione solo il microsatellite GTn nell'introne 4 (26). L'associazione di ICOS è stata invece stabilita con il morbo celiaco nella popolazione finlandese per mezzo di un lavoro che ha preso in considerazione il polimorfismo nell'introne 1 e alcuni SNPs della regione 3'UTR; gli autori hanno utilizzato il Transmission Disequilibrium Test (TDT) per valutare la trasmissione preferenziale degli alleli e degli eventuali aplotipi e hanno ottenuto risultati significativi per il polimorfismo dell'introne 1 (+173 T/C) e per l'aplotipo costituito dai seguenti alleli T (+173), C (+602), A (+930), T (+1459), C (+1564), T (+1624), G (+1862) C (+2373) (34).

Recentemente, uno studio italiano ha pubblicato il riscontro di un'associazione genetica-statistica di un aplotipo comprendente il polimorfismo +1564 T/C di ICOS e la ripetizione (CAA)_n di CD28 con la suscettibilità ai linfomi non Hodgkin (65).

SCOPO DEL LAVORO

Dal momento che ICOS sembra essere coinvolto nell'immunopatogenesi e nella gravità della forma murina della sclerosi multipla (EAE), lo scopo di questo lavoro è valutare l'importanza dei polimorfismi e/o mutazioni dell'esone 5 e della regione 3'UTR del gene ICOS nella suscettibilità alla sclerosi multipla.

RISULTATI

A. Analisi della regione 3' UTR del gene ICOS

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

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

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

L'analisi statistica-informatica ha evidenziato 3 principali aplotipi (A, B e C) che rappresentano circa il 99% delle possibili combinazioni aplotipiche (fig. 1B). Dato il forte LD, questi 3 SNPs (+1459, +1564, +2373) sono di per se sufficienti per identificare i 3 aplotipi suddetti. La frequenza allelica e genotipica di questi 3 SNPs, che a loro volta individuano le 3 combinazioni aplotipiche, e' stata valutata nei pazienti e nei controlli. (table1). La frequenza dell'allele +1564 T (aplotipo A) e' risultata essere maggiore nel gruppo dei controlli rispetto a quello dei pazienti, mentre i SNPs +1459 T e +2373 C, che a loro volta individuano gli aplotipi B e C rispettivamente, sono risultati avere una frequenza maggiore nei pazienti (table 1). Le suddette differenze non raggiungono la significativita' statistica dato il ridotto numero dei soggetti coinvolti nello studio.

B. Il genotipo AA correla con i livelli di espressione di ICOS e di IL10.

L'analisi degli aplotipi indica che, dei due aplotipi piu' frequenti nei pazienti (B e C), quello che presenta le maggiori differenze con l'aplotipo piu' frequente nei controlli (A), e' il C. Infatti, gli aplotipi A e C condividono solo un SNP (+2373 G), mentre il B ne condivide 4 con l'aplotipo A (+930 G, +1459 A, +1624 G, +1862A) e 3 con l'aplotipo C (+602 C, +1564 C,

+2007 A). Per capire se questi aplotipi influenzano i livelli di attivazione cellulare dei linfociti T, abbiamo analizzato le cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC) attivati con CD3/TCR di controlli sani omozigoti per l'aplotipo A (vale a dire +1459 AA, +1564 TT, +2373 GG) e di controlli sani portatori di almeno un aplotipo C (+1459 T, +1564 C, +2373 G). Dal momento che i soggetti con genotipo CC sono estremamente rari, abbiamo scelto di analizzare i soggetti eterozigoti AC (+1459 AT, +1564 TC, +2373 GG). L'analisi e' stata incentrata sui i livelli di espressione di ICOS e sulla conseguente induzione delle citochine IL10 e IFN γ , note per essere modulate da ICOS stesso. E' stata inoltre valutata l'espressione di CD25, HLA-DR, e la secrezione di IL2, IL4, IL5, TNF α per avere una visione globale del livello di attivazione dei linfociti T nelle due popolazioni. I PBMC di 24 soggetti sani (12 omozigoti AA e 12 eterozigoti AC) sono stati attivati con anti-CD3 e analizzati al giorno T2 e T4 dall'attivazione. I risultati hanno mostrato che i linfociti T dei soggetti omozigoti AA esprimono livelli di ICOS inferiori e livelli di IL10 superiori rispetto ai soggetti eterozigoti AC ($p < 0.05$, Mann Whitney test). Al contrario, nessuna differenza e' stata riscontrata per i livelli di proliferazione, di espressione di CD25 e di HLA-DR e di secrezione delle altre citochine (fig.2).

C. L'omozigosi per l'aplotipo A correla con la suscettibilita' alla SM e con la gravita' della malattia

Dal momento che e' stato riscontrata un'associazione funzionale tra l'omozigosi per l'aplotipo A e i livelli di espressione di ICOS e della citochina anti infiammatoria IL10, e che lo studio pilota condotto inizialmente ha suggerito che la frequenza dell'omozigosi per l'aplotipo A potrebbe essere inferiore nei controlli rispetto ai pazienti, abbiamo valutato la frequenza degli omozigoti AA in 441 pazienti SM e 793 controlli sani sequenziando i polimorfismi alle seguenti posizioni +1459, +1564, +1624. La tab 2 mostra come gli omozigoti AA sono significativamente piu' frequenti nel gruppo dei controlli rispetto ai pazienti ($p = 0.019$, OR= 0.75). I suddetti dati suggeriscono che l'aplotipo A potrebbe agire come fattore recessivo protettivo nei confronti della SM, mentre gli aplotipi B e C potrebbero giocare un ruolo predisponente.

Data la vicina localizzazione di ICOS al gene CTLA4 e data la nota associazione dei SNPs di CTLA4 al promotore (-318 C/T) e all esone 1 (+49 A/G) con note malattie autoimmuni quali T1DM, tiroiditi, LES e SM, e' possibile che la suddetta associazione dell'aplotipo A con la SM sia in realta' una conseguenza del suo LD con questi SNPs. Inoltre, recentemente e' stato pubblicato un lavoro che associa il polimorfismo -1413 G/A al promotore di ICOS con la

produzione di citochine di tipo Th2 e con l'allergia IgE mediata. Per escludere che i polimorfismi da noi studiati fossero in realta' in LD con quelli di CTLA4 e con quello al promotore di ICOS, ne abbiamo valutata la frequenza in 49 pazienti e 54 controlli e il valore di D' di r^2 con i SNPs +1459 A/T, +1564 T/C, +1624 C/T. Nessuno dei 3 polimorfismi della regione 3' UTR di ICOS ha mostrato un significativo LD con i SNPs di CTLA4 e del promotore di ICOS (data not shown).

Per valutare se questi aplotipi avessero un ruolo nel condizionare la severita' della malattia, abbiamo paragonato le condizioni cliniche dei pazienti con diverso genotipo, in particolare tra omozigoti AA e non AA. Eta' e sesso non differivano tra i due gruppi. L'analisi ha mostrato che i pazienti con genotipo AA mostrano una maggiore frequenza di Primari Progressivi (PP) (8.4% vs 2.5%, $p=0.0068$) (table 3). Inoltre, se si considerano solo i pazienti Remissivi Remittenti (RR), i pazienti con genotipo AA mostrano un tasso di ricadute annuali inferiore rispetto ai pazienti con genotipo non AA (mediana annua 0.7 vs 1.4, $p 0.0001$) (table 4). Infine, sempre nel gruppo dei pazienti RR, quelli con genotipo AA mostrano un decorso clinico migliore rispetto ai pazienti non AA (mediana MSSS 1.9 vs 3.7, $p 0.008$) (table 4), mentre nessuna differenza e' stata trovata considerando i pazienti PP.

DISCUSSIONE

Questo lavoro ha evidenziato come un aplotipo formato da SNPs del gene di ICOS nella regione 3'UTR influenzi non solo la suscettibilità alla SM, ma anche il decorso clinico, probabilmente modulando l'attività dei linfociti T.

Per cominciare, l'omozigosi per l'aplotipo A sembra essere un fattore protettivo recessivo dal momento che la sua frequenza è inferiore nei pazienti rispetto ai controlli e che protegge dalla malattia con un OR di 0.75. Un precedente lavoro condotto su un gruppo Norvegese non ha evidenziato nessuna associazione dei SNPs di ICOS con la SM, ma non ha analizzato la regione 3'UTR. Inoltre, Haimila et al., hanno dimostrato che un aplotipo di ICOS formato dai seguenti SNPs +173T-602C-930A-1459T-1564C-1624T-1862G-2373G è associato con il morbo celiaco. L'aplotipo descritto da Haimila et al., condivide 7 SNPs con il nostro aplotipo C e solo 1 con il nostro aplotipo A.

Inoltre, l'omozigosi per l'aplotipo A influenza la malattia in maniera complessa. Da una parte, tra i pazienti RR, quelli con genotipo AA mostrano un decorso clinico migliore, meno ricadute annue e una più lenta progressione della malattia rispetto ai pazienti con genotipo non AA. D'altra parte, i pazienti con genotipo AA mostrano una maggiore frequenza di PP, tipicamente associata con un peggior prognosi.

Infine, l'omozigosi AA influenza l'espressione di ICOS sulla membrana dei linfociti T in soggetti sani, come indicato dai dati che dimostrano che i soggetti omozigoti AA esprimono livelli inferiori di ICOS rispetto ai soggetti eterozigoti AC (e maggiori livelli di IL10). I dati mostrano che si tratta di un effetto specifico, dal momento che proliferazione, espressione di altri marker di attivazione quali CD25 e HLA-DR, e la secrezione di citochine quali IL2, IL4, IL5, IFN γ e TNF α non hanno mostrato nessuna differenza tra i due gruppi. Questo effetto potrebbe essere direttamente imputabile alla localizzazione dei SNPs, dal momento che la regione 3'UTR può influenzare la stabilità del mRNA. I bassi livelli di espressione di ICOS mostrati dai soggetti sani con genotipo AA potrebbero, almeno in parte, favorire la secrezione di IL10, come indicato da lavori che mostrano una maggiore espressione di ICOS nella sottopopolazione Th1 rispetto alla Th2.

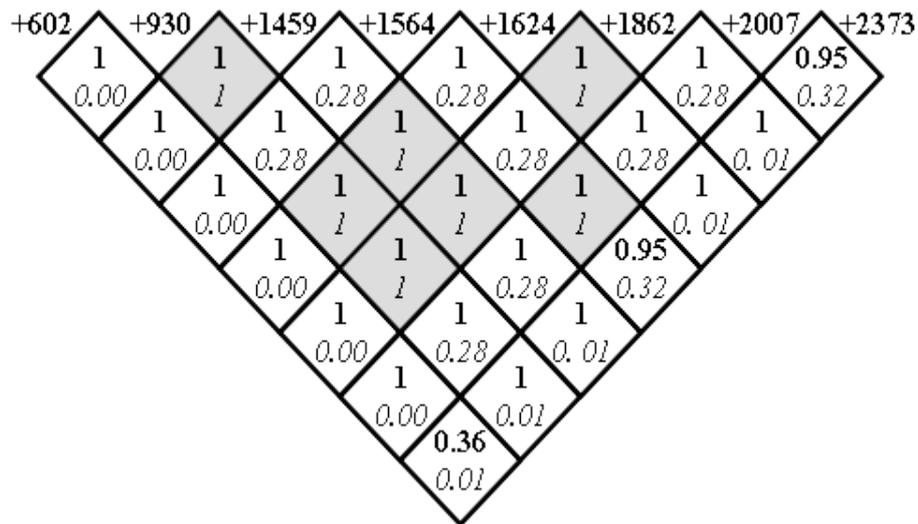
Il perfetto LD osservato tra i SNPs +602, +1564 e +2007, non consente di discernere quale di questi 3 SNPs sia realmente importante nel determinare l'effetto osservato.

Nell'insieme, i dati suggeriscono che l'omozigosi in AA potrebbe agire a due livelli sulla SM. Da una parte, inibisce la fase di induzione della malattia, sia all'esordio che al momento delle ricadute. Gli alti livelli di IL10 mostrati dai soggetti AA potrebbero avere un effetto protettivo, dal momento che IL10 è tipicamente una citochina anti infiammatoria secreta dalla sottopopolazione Th2 e dai linfociti T regolatori e inibisce sia la differenziazione in Th1 dei linfociti sia l'attivazione macrofagica, entrambi componenti caratteristici delle placche di demielinizzazione. In linea con quanto appena detto, IL10 sembra essere una citochina importante anche nel mediare la remissione nei modelli murini di SM.

D'altra parte, i pazienti omozigoti AA mostrano una maggiore frequenza della forma PP. Questa apparente inconsistenza potrebbe essere dovuta anche al differente background genetico dei pazienti PP e RR. Per esempio, è stato pubblicato che difetti genetici nello spegnimento della risposta immunitaria imputabili al sistema Fas/FasL che inibiscono l'apoptosi dei linfociti T possono favorire l'insorgenza della forma PP nei pazienti con SM. In questo background genetico, gli alti livelli di IL10 mostrati dai soggetti AA potrebbe ulteriormente inibire l'apoptosi dei linfociti. In linea con quanto detto, è stato proposto che IL10 giochi un ruolo importante nell'induzione della Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa, il tipico esempio di patologia indotta da un difetto nel sistema di apoptosi dei linfociti.

Per concludere, l'omozigosi AA sembra essere un fattore protettivo per quel che riguarda la suscettibilità e la progressione della SM, probabilmente perché influenza i livelli di espressione di ICOS e di secrezione di IL10. D'altronde, lo stesso meccanismo che sembra proteggere dalla SM e favorirne un decorso clinico migliore, sembra anche favorire l'insorgenza della forma PP. Questo dualismo sembra richiamare l'effetto che ICOS ha sull'EAE, il modello murino di SM: l'inibizione di ICOS nella fase di presentazione dell'antigene aggrava la malattia, ma la attenua se avviene durante la fase efferente della risposta immunitaria. È interessante notare che i topi deficienti in Fas sembrano essere più resistenti alla malattia ma sembrano anche essere più suscettibili ad un esordio PP, invece del tipico esordio RR (69). Lo stesso effetto è visibile nel sesso maschile, tanto protettivo nei confronti della SM quanto predisponente nei confronti dell'esordio progressivo (70).

Figure 1. Linkage disequilibrium pattern across the ICOS 3'UTR. A: D' (Lewontin D value) and r^2 are reported in the triangle, bold and italics, respectively. All values refer to the allele shown in the table 1 (i.e. the allele having higher frequency in the controls than in MS patients). Grey boxes mark significant LD values ($p < 0.05$). **B:** estimated 3 haplotype combinations in MS patients and controls.



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

Fig.1

Figure 2. ICOS expression and IL10 secretion in activated T cells from healthy controls carrying the AA or AC genotypes. PBMC were activated with anti-CD3 mAb (0.1 µg/mL). IL10 secretion was evaluated after 2 days of culture (left panel) and ICOS expression after 4 days of culture (right panel). Results are the mean+SE of data obtained in three experiments, each assessing 4 AA homozygotes and 4 AC heterozygotes (total subjects analyzed were 12 AA and 12 AC). ICOS expression is shown as the relative expression % calculated as follows: (result displayed by each subject / mean of the results displayed by the 4 AA subjects run in the same experiment) X 100; 100% indicates the mean of the results obtained with the AA subjects in each experiment. Statistical analysis was performed with the Mann-Whitney U test.

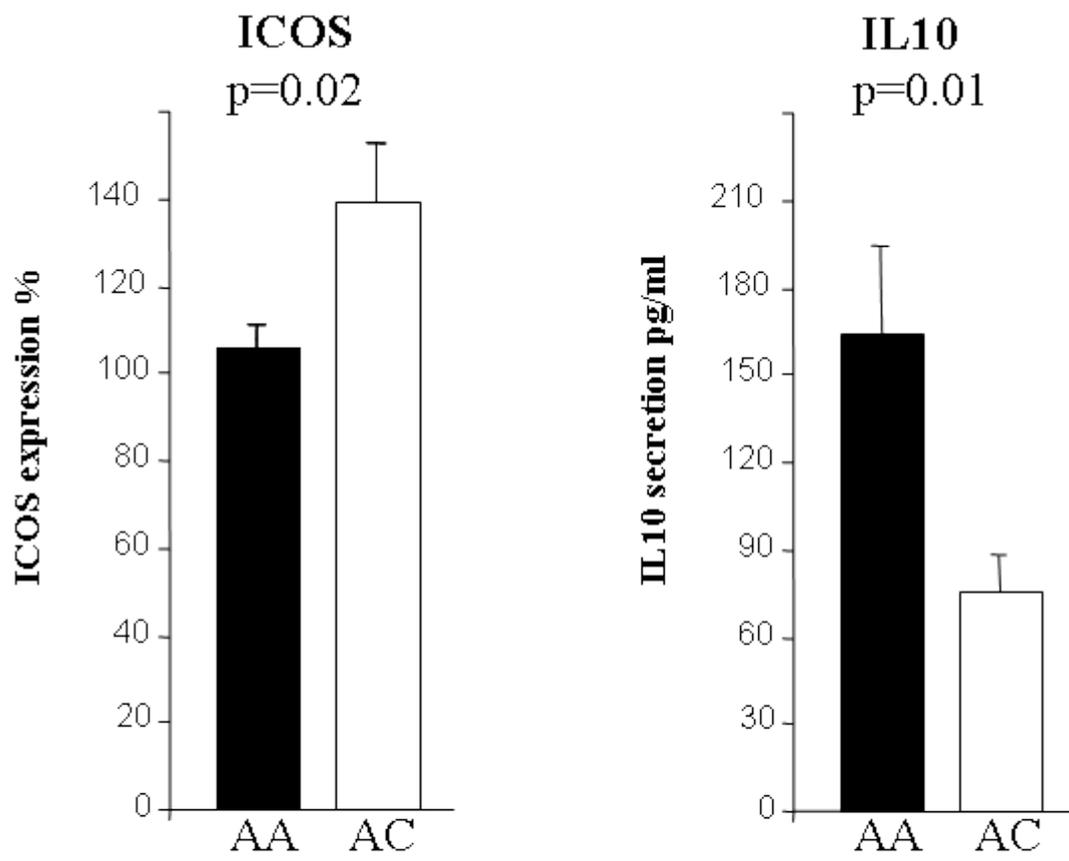


Figure 2

Table 1. Allele and genotype distribution in MS patients and controls for +1459, +1564, +2373

ICOS SNPs

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

a :Number of subjects tested with the complete set of 8 SNPs

b: frequency %

Table 2. Frequency distribution of ICOS' genotypes in 441 MS patients and 793 controls.

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

a: number of subjects, proportions are shown in the brackets.

b: Odds ratio (OR) and 95% confidence limits (CI).

c: P values were calculated using the Yates corrected χ^2 test.

d: indicative distribution of reconstructed non-AA genotypes

Table 3. Frequency distribution of disease onset in MS patients displaying different ICOS genotypes

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

a: number of subjects, proportions are shown in the brackets.

b: Fisher Exact test

Table 4. Outcome measures in patients with bout onset displaying different ICOS genotypes

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

a:

median values; interquartile ranges are shown in the brackets

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

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

BIBLIOGRAFIA

1. Redoglia V, Dianzani U, Rojo JM, Portoles P, Bragardo M, Wolff H, Buonfiglio, D, Bonissoni S, and Janeway CA jr. Characterization of H4: a murine T lymphocyte activation molecule functionally associated with the CD3/TCR. *Eur J Immunol.* 1996. 26: 2781-89.
2. Buonfiglio, D, Bragardo M, Bonissoni S, Redoglia V, Cauda R, Zupo S, Burgio VL, Wolff H, Franssila K, Gaidano G, Carbone A, Janeway CA jr, and Dianzani U. Characterization of a novel human surface molecule selectively expressed by mature thymocytes, activated T cells and subsets of T cell lymphomas. *Eu J Immunol.* 1999. 29:2863-74.
3. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R , Anagnostopoulos I, and Kroczek RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulatory structurally and functionally related to CD28. *Nature.*1999. 397:263-66.
4. Donatella Buonfiglio, Manuela Bragardo, Valter Redoglia, Rosanna Vaschetto, Flavia Bottarel, Sara Bonissoni, Thea Bensi, Caterina Mezzatesta, Charles A. Janeway jr. and

- Umberto Dianzani. The T cell activation molecule H4 and the CD28-like molecule ICOS are identical. *Eur. J. Immunol.* 2000. 30: 3463–3467.
5. Thompson CB, Allison JP. The emerging role of CTLA4 as an immune attenuator. *Immunity.* 1997. 7:445-50.
 6. Harding FA, McArthur JG, Gross A, Raulet DH, and Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature.* 1992. 356:607-9.
 7. Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors. New pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Ann Rev Immunol* 2002; 20: 29-53.
 8. Coyle, a.J., S. Lehar, C. Lloyd, J. Tian, T. Delaney, S. Manning, T. Ngyen, T. Burwell, H. Schneider, J.A. Gonzalo, M. Gosselin, L.R. Owen, C.E. Rudd, and J.C. Gutierrez-Ramos.. The CD28- related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 2000.13:95-105
 9. Dong C., Nurieva R.I. Regulation of immune and autoimmune response by ICOS. *J. of autoimm* 2003. 00: 1-6
 10. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T et al. T-cell costimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 1999. 402. 827-832.
 11. Nurieva RI, Mai XM, Forbush K, Bevan MJ, Dong C. B7h is required for T cell activation, differentiation, and effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:14163-14168.
 12. Riley JL, Blair PJ, Musser JT et al. ICOS costimulation requires IL-2 and can be prevented by CTLA-4 engagement. *J Immunol.* 2001;166:4943-4948
 13. Tada Y et al.. CD28 deficient mice are highly resistant to collagen-induced arthritis. *J. Immunol* 1999, 162. 203-208
 14. Lohning M, Hutloff A, Kallinich T et al. Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J Exp Med.* 2003;197:181-193
 15. Liu X, Bai XF, Wen J et al. B7H costimulates clonal expansion of, and cognate destruction of tumor cells by, CD8(+) T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 2001;194:1339-1348
 16. Riley JL., June CH. The CD28 family: a T cell rheostat for therapeutic control of T cell activation. *Blood,* 2004.
 17. Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science.* 1993;261:609-612
 18. Gonzalo JA, Tian J, Delaney T et al. ICOS is critical for T helper cell-mediated lung mucosal inflammatory responses. *Nat Immunol.* 2001;2:597-604

19. Lorenz et al. Role of apoptosis in autoimmunity. *Apoptosis*. 2000 Nov;5(5):443-9. Review.
20. Takeda and Dynan. Autoantibodies against DNA double-strand break repair proteins. *Front Biosci*. 2001 Nov 01;6:D1412-22. Review. 2001
21. Matsuura et al., 1998
22. Bertolino et al., Death by neglect as a deletional mechanism of peripheral tolerance. *Int Immunol*. 1999 Aug;11(8):1225-38.
23. Sharma et al., 2000; Vincent C, 2001
24. Budihardjo et al., 1999; Hacker, 2000; Shy, 2002
25. Ueda H. et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA-4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003. 423. 506-511
26. Ban Y. et al. Analysis of the CTLA-4, CD28 and ICOS genes in autoimmune thyroid disease. *Genes and Autoimmunity*, 2003. 4. 586-593.
27. Ihara K. et al. Association studies of CTLA-4, CD28 and ICOS gene polymorphisms with type 1 diabetes in Japanese population. *Immunogenetics*, 2001. 53. 447-454.
28. Huang et al., Association of CTLA4 gene A-G polymorphism with type 1 diabetes in Chinese children. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000 Feb;52(2):153-7.
29. Waterhouse et al., 1995
30. Karandikar et al., CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med*. 1996 Aug 1;184(2):783-8.
31. Perrin et al., CTLA-4 blockade enhances clinical disease and cytokine production during experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol*. 1996 Aug 15;157(4):1333-6.
32. Khoury et al., Mechanisms of acquired thymic tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis: thymic dendritic-enriched cells induce specific peripheral T cell unresponsiveness in vivo. 1995.
33. Miller et al., Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE. *Immunity*. 1995 Dec; 3(6):739-45.
34. Haimila K et al. Genetic association of coeliac disease susceptibility to polymorphisms in the ICOS gene on chromosome 2q33. *Genes and immunity* 2004. 1-8
35. Rotmann JB. et al. The costimulatory molecules ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nature Immunol* 2001. vol 2. No 7. 605-611.
36. Dong C et al., ICOS costimulatory receptor is essential for T cell activation and function. *Nature* 2001. 409. 97-101.
37. Bourdoulous S et al., 1995. Anergy induction in encephalitogenic T cells by brain microvessel endothelial cells is inhibited by IL-1. *Eur J Immunol* 25.1176-1183

38. Sporici AR. et al., ICOS ligand costimulation is required for T cellencephalitogenicity. *Clinical Immunol* 2001. vol 100. No 3. 277-288.
39. Wiendl H et al. The CD28 related molecule ICOS: T cell modulation in the presence and absence of B7.1/2 and regulational expression in multiple sclerosis. *J neuroimmunol*, 2003. 140. 177-187.
40. Wiendl H et al. Muscle fibers and cultured muscle cells express the B7.1/2 related costimulatory molecule ICOSL: implications for the pathogenesis of inflammatory myopathies. *Brain* 2003.126. 1026-1035.
41. Hemmer B et al. New concepts i the immunopathogenesis of the multiple sclerosis, 2002. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 291-301.
42. Lovett-Rache AE et al. Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28 mediated costimulation in MS patients. A marker of memory/activated T cells. *J clin. invest.* 1998. 101. 725-730.
43. Markovic-Plese S et al. CD4+ CD28- costimulation independent T cells in MS. *J clin invest* 2001. 108. 1185-1194.
44. Haimila KE et al. Genetics polymorphisms of the human ICOS gene. 2002. *Immunogenetics*, 53. 1028-1032
45. Haaning Andersen AD et al. Allelic variation of the inducible costimulator gene: detection of polymorphisms, analysis of the promoter region and extended haplotype estimation. 2003. *Tissue Antigens*. 61. 276-285.
46. Riley J.L. and June C. H. The CD28 family: a T cell rheostat fot therapeutic control of T cell activation. 2005. *Blood*. 105. 13-21.
47. Dong C. et al., ICOS costimulatory receptor is essential fot T-cell activation and function. 2001. *Nature* 409. 97-102.
48. Nurieva R.I. et al. B7-h is required for T cell activation , differentiation, and effector function. *PNAS* 100. 2003. 14163-14168.
49. Nurieva R.I. et al. Transcriptional regulation of Th2 differentiation by inducible costimulator. 2003. *Immunity* 18. 801-811.
50. Attur M.G. et al. Il-17 up regulation of NO production in human osteoarthritis cartilage. 1997.*Arthritis Rheum*. 40. 1050-1053.
51. Nurieva R.I. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS-B7h interaction. 2005. *Clinical Immunology*. 115. 19-25.
52. Riley JL. et al. Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS and CTLA 4 receptors.2002. *PNAS* 99. 11790-11795.

53. Kroczek RA et al. Emerging paradigms of T cell co-stimulation. 2004. *Current opinion in immunology* 16. 321-327.
54. Beier KC. et al. Induction, binding, specificity and function of human ICOS. 2000. *Eur J Immunol* 30. 3707-3717.
55. Watanabe M. et al. ICOS-mediated costimulation on Th2 differentiation is achieved by enhancement of IL-4 receptor mediated signaling. 2005. *The journal of immunology*. 1989-1996.
56. Wassink L. et al. ICOS expression by activated human Th cells is enhanced by IL-12 and IL-23: increased ICOS expression enhances the effector function of both Th1 and Th2 cells. 2004. *The journal of immunology*. 1779-1786.
57. Benjamin GS. et al. ICOS is essential for the development of experimental autoimmune myasthenia gravis. 2004. *Journal of neuroimmunology*. 16-25.
58. Hideki F. et al. Attenuation of experimental autoimmune myocarditis by blocking activated T cells through inducible costimulatory molecule pathway. 2003. *Cardiovascular Research* 59. 95-104.
59. Nurieva R. et al. Inducible costimulator is essential for collagen induced arthritis. 2003. *J Clin Invest* 111. 701-706.
60. Hutloff A. et al. Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. 2004. *Arthritis and Rheumatism* 50. 3211-3220.
61. Okamoto T. et al. Expression and function of the costimulator H4/ICOS on activated T cells of patients with rheumatoid arthritis. 2003. *J Rheumatol* 30. 1157-1163.
62. Yang JH. et al. Expression and function of inducible costimulator on peripheral blood T cells in patients with systemic lupus erythematosus. 2005. *Rheumatology*.
63. Zhoughua YX et al. Expression and clinical significance of inducible costimulato on peripheral blood T lymphocyte subsets in patients with systemic lupus erythematosus. 2005.
64. Lorentzen AR. et al. Lack of association with the CD28/CTLA4/ICOS gene region among Norwegian multiple sclerosis patients. 2005. *J of Neuroimmunology*.
65. Piras G et al. Genetic analysis of the 2q33 region containing CD28-CTLA4-ICOS genes: association with non Hodgkin's lymphoma. 2005. *British Journal of Haematology* 129. 784-790.
66. Lee WI. et al. Inducible costimulator molecule, a candidate gene for defective isotype switching, is normal in patients with hyper-IgM syndrome of unknown molecular diagnosis. 2003. *J Allergy Clin. Immunol.* 112. 958-964.

67. Conley ME. Et al. The role fo inducible costimulator in immunodeficiency. 2004. *Clinical Immunology* 113. 221-223.
68. Laursen LO. Et al. Normal ICOS, ICOSL and AID alleles in Danish patients with common variable immunodeficiency. *Scandinavian Journal of immunology* 61. 2005. 566-574.
69. Malipiero U, Frei K, Spanaus KS, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis is chronic/relapsing in perforin knockout mice, but monophasic in Fas- and Fas-ligand deficient *lpr* and *gld* mice. *Eur J Immunol* 1997;27:3151-3160.
70. Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain* 2003;126:770-782.

ATTIVITA' FORMATIVA SVOLTA:

- Corso di Statistica. Coordinatore: Prof. Magnani.
- Approccio allo studio dei geni di suscettibilità alle malattie multifattoriali. Prof. D'Alfonso.
- Corso di inglese: Dott. Colin Irvingbell.

Seminari Interni al Dipartimento di Scienze Mediche**Anno 2002/03**

23 Gennaio 2003

Prof. Gianluca Gaidano

Applicazioni di medicina molecolare alla diagnosi e prognosi delle neoplasie

28 Gennaio 2003

Dr. Daniela Cilloni

Strategie di valutazione della malattia minima residua in Oncoematologia

29 Gennaio 2003

Dott. Ennio ONGINI

Farmaci innovativi per il trattamento di malattie neurodegenerative

30 Gennaio 2003

Dr. Martino Introna

Meccanismi molecolari di azione degli anticorpi terapeutici

27 febbraio 2003

Vittorio PERFETTI M.D.

"La Drosophila melanogaster come sistema modello: l'esempio del gene minifly."

7 Marzo 2003

Prof. Pierangelo GEPPETTI

Trpv1 (recettore per la capsaicina): possibile ruolo fisiopatologico dalle vie respiratorie all'emicrania

18 Marzo 2003

Dr. Anne Boullerne

"Multiplex role of Nitric Oxide in Multiple Sclerosis".

22 Maggio 2003

Dr.ssa Stefania Bottardi

Developmental stage-specific epigenetic control of human beta globin gene expression is set in multipotent hematopoietic

progenitor cells
18 Giugno 2003
Prof. Fabrizio Loreni
Regolazione traduzionale dell'espressione genica: micro RNA e
sintesi dei ribosomi

Seminari Interni al Dipartimento di Scienze Mediche

Anno 2003/04

30 Gennaio 2004

Prof. . Magnus INGELMAN-SUNDBERG

Pharmacogenetics: a tool for a more efficient and safe drug therapy

30 gennaio 2004

BICE CHINI

LIPID RAFTS E RECETTORE PER L'OSSITOCINA:

MODULAZIONE DEL SIGNALLING E DEL CONTROLLO DELLA PROLIFERAZIONE
CELLULARE

10 marzo 2004

Prof. Guido Valesini

TNF, anti-TNF ed autoimmunità

31 Marzo 2004

Dr ANTONIA FOLLENZI

Espressione epato-specifica del fattore IX antiemofilico mediante l'uso di vettori lentivirali

3 maggio 2004

Dr Frédéric RIEUX-LAUCAT

"Genetic bases of the Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) subtypes"

20 maggio 2004

Alberto MARTINI

Le artriti croniche del bambino

25 maggio 2004

Antonio PUCCETTI

Virus e malattie autoimmuni

28 maggio 2004

ANGIOLO BENEDETTI

IL RETICOLO ENDOPLASMATICO UN LABIRINTO METABOLICO

18 Febbraio 2004

BICE CHINI

LIPID RAFTS E RECETTORE PER L'OSSITOCINA:

MODULAZIONE DEL SIGNALLING E DEL CONTROLLO DELLA PROLIFERAZIONE
CELLULARE

14 giugno 2004
PROF. DAVID MURPHY

BIOMEDICAL DISCOVERY USING MICROARRAYS:
PRINCIPLES, PROSPECT AND PROBLEMS.

FUNCTIONAL GENOMICS OF HYPOTHALAMIC HOMEOSTATIC PLASTICITY

29 giugno 2004

Prof. Emilio Hirsch

PI 3-KINASE □ CONTROLS CARDIAC CONTRACTILITY AND HYPERTROPHY THROUGH
KINASE-DEPENDENT AND INDEPENDENT FUNCTIONS

30 giugno 2004

Manlio FERRARINI
Meccanismi patogenetici della
Leucemia Linfatica Cronica

Seminari Interni al Dipartimento di Scienze Mediche

Anno 2004/05.

2 Dicembre 2004

Riccardo Bertini

REPERTAXIN: un nuovo inibitore di IL-8,. Risultati preclinici ed identificazione del meccanismo d'azione

11 Marzo 2005-09-29

Margherita Ruoppolo

Proteomica dell'epitelio intestinale

21 Marzo 2005-09-29

Rosanna Asselta

Sclerosi Multipla: Ricerca di geni di suscettibilità nella popolazione finlandese

23 Marzo 2005-09-29

Stefania Nicola

Le cellule dendritiche: un giocatore chiave nella risposta immunitaria. quali e quanti tipi?

6 Aprile 2005

Gerardo Lopez Rodas

Toward regulation of gene expression by chromatin modification: aome biomedical model

30 Maggio 2005

Gianpiero Pescarmona

Il dolore articolare: un problema chimico o biochimico?

1 Giugno 2005

Antonio Amoroso

Geni e trapianti

8 Giugno 2005

Torre, Fortina Elisabetta, Patricia Momigliano, Pelissero, Prat.

Procreazione medicalmente assistita: aspetti medici, biologici e legali

17 Giugno 2005

Guido Poli

La tossina della pertosse ed il suo B oligomero: nuovi farmaci immunostimolanti e anti-HIV

15 Luglio 2005

Stefano Gustincich

Meccanismo molecolare della malattia di Parkinson

12 Settembre 2005

Ornella PArolini

Caratteristiche e potenzialità delle cellule isolate dalle membrane fetali umane: amnion e corion

13 Settenbre 2005

Steven Ellis

Function of ribosomal protein S19: implication for Diamond Blackfan Anemia

Seminari Interni al Dipartimento di Scienze Mediche

Anno 2005/06

18 Novembre 2005.

Dr.Diego Cotella

“Cardiac potassium channel regulation by accessory 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.”.

Partecipazione a Congressi Nazionali:

2st National Conference SIICA, Verona May 28-30, 2003..

3rd National Conference SIICA, Ischia, April 24-27, 20 04.

XXVII National Congress SIP, Modena, February 20-23, 2005.

Partecipazione a congressi internazionali

FASEB, 12-17 August 2006, Indian Wells, CA “*Lymphocytes and Antibodies*”

Publicazioni

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

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

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

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

- **T cell apoptosis is impaired in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy**
C. Comi, MD, P. Gaviani, MD, M. Leone, MD, **L. Castelli**, MS, R. Mesturini, MS, G. Ubezio, MD, A. Chiocchetti, MS, M. Osio, MD, F. Muscia, MD, G. Bogliun, MD, G. Corso,

MD, A. Gavazzi, MD, C. Mariani, MD, R. Cantello, MD, PhD, F. Monaco, MD, U. Dianzani, MD, PhD. (*J Peripher Nerv Syst.* 2006 Mar;11(1):53-60)

- **Defective function of the Fas apoptotic pathway in type 1 diabetes mellitus correlates with age at onset**
Defranco S., Chiocchetti A., Ferretti A., **Castelli L.**, Cadario F., Cerutti F., Rabbone I., Indelicato M., Mazzarino M.C., Chessa M., Bona G., Dianzani U. (submitted)

- **ICOS cooperate with CD28, IL-2 and IFN- γ and modulates activation of human naïve CD4+ T cells.**
Mesurini R., Chiocchetti A., **Castelli L.**, Nicola S., Bensi T., Ferretti M., Comi C., Dong C., Rojo J. M., Yagis J. and Dianzani U. (submitted)

- **ICOS gene haplotypes correlate with Multiple Sclerosis development and progression and influence ICOS function.**
Castelli L., Comi C., Chiocchetti A., Mesturini R., Nicola S., Galimberti D., Scarpini E, Rojo J. M., Yagi J., Perla F., Maurizio L., Monaco F., Dianzani U. (submitted)

- **A sequence variation in the MOG gene is involved in Multiple Sclerosis susceptibility**
D'Alfonso S, Bolognesi E, Guerini FR, Barizzone N, Bocca S, Ferrante D, **Castelli L**, Ferrante P, Naldi P, Caputo D, Ballerini C, Salvetti M, Galimberti D, Trojano M, Momigliano-Richiardi P. (submitted)

ABSTRACT

- ✓ **Involvement of the osteopontin gene (OPN) in development of autoimmune/lymphoproliferative patterns**

Chiocchetti A., Indelicato M., Bensi T., Mesturini R., Sametti S., Mangolini M., **Castelli L.**, Santoro C. and Dianzani U. 2nd National Conference SIICA, Verona 28-31 Maggio 2003

- ✓ **Osteopontin gene haplotypes correlate with OPN serum levels and multiple sclerosis development and progression.**

Chiocchetti A., Comi C., **Castelli L.**, Ubezio G, Indelicato M., Mazzarino M.C., D'Alfonso S., Monaco F., Leone M., and Dianzani U. 3rd National Conference SIICA, Ischia 24-27 Aprile 2004

- ✓ **Osteopontin gene haplotypes correlate with OPN serum levels and multiple sclerosis development and progression.**

Comi C *, Chiocchetti A. *, Indelicato M., **Castelli L.**, Mesturini R., Bensi T., Sametti S., Mazzarino M.C., Giordano M., D'Alfonso S., Momigliano-Richiardi P., Liguori M., Santoro C., Monaco F., Leone M., and Dianzani U., MD, PhD. Lisbona 2004

- ✓ **Osteopontin gene haplotypes correlate with OPN serum levels and multiple sclerosis development and progression**

Chiocchetti A¹, Comi C¹⁻³, **Castelli L**¹, Ubezio G¹, Indelicato M², Mazzarino MC², D'Alfonso S¹, Monaco F³, Leone M³, and Dianzani U¹. 4th International Conference, FOCIS 2004, 18-23 luglio 2004, Montreal.

- ✓ **Osteopontin gene is involved in the development of autoimmune disease..**

Chiocchetti A., Indelicato M., Bensi T., Comi C, Monaco F., Dalfonso S, Mesturini R., Sametti S., **Castelli L.** P. C, Mazzarino, Momigliano-Richiardi e Dianzani U. National Conference SIP, Modena 20-23 Febbraio 2005

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

Castelli L., Comi C., Chiocchetti A., Mesturini R., Nicola S., Galimberti D., Scarpini E Rojo J. M., Yagi J., Perla F., Maurizio L., Monaco F.,Dianzani U. 22nd Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis. September 27–30, 2006 / Madrid, Spain

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

Castelli L., Comi C., Chiocchetti A., Mesturini R., Nicola S., Galimberti D., Scarpini E Rojo J. M., Yagi J., Perla F., Maurizio L., Monaco F.,Dianzani U. 14-18 October, Bari, 2006 Italy. XXXVII congress of the Italian Society of Neurology (Società Italiana di Neurologia—SIN),