

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



**Dottorato di Ricerca in  
Medicina Molecolare**

**Relazione I° anno (2005-2006)**

**Ciclo XXI**

**Variazioni del gene di perforina in pazienti con Diabete Mellito di  
Tipo 1 (T1DM)**

**Elisabetta Orilieri**

# INTRODUZIONE

## 1. APOPTOSI NEL SISTEMA IMMUNITARIO

### *1.1 Maturazione dei linfociti negli organi linfatici primari (tolleranza centrale)*

La morte cellulare programmata (MCP) svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo, nella regolazione e nel corretto funzionamento del sistema immunitario (Krammer P.H., 2000). Nel corso della loro maturazione, rispettivamente nel midollo osseo e nel timo, i precursori dei linfociti B e T inizialmente riarrangiano in modo casuale i geni per i rispettivi recettori per l'antigene (Ig per i linfociti B e TCR per i linfociti T) e successivamente subiscono un rigoroso processo di selezione clonale che porta alla morte per MCP dei linfociti che riconoscono antigeni *self*. Grazie a questo processo, il "repertorio" di recettori per l'antigene che raggiunge il sangue periferico sarà costituito quasi esclusivamente da recettori per antigeni *non-self*.

Nel timo, organo linfatico primario per i linfociti T, questo processo di selezione del "repertorio" periferico è complicato ulteriormente dal particolare meccanismo di riconoscimento dell'antigene proprio dei linfociti T. Questi infatti non riconoscono l'antigene in forma nativa, ma solo dopo che esso è stato "processato" dalle cellule presentanti l'antigene (APC, *antigen presenting cells*) ed esposto come peptide complessato ad una molecola MHC, un sistema molecolare poligenico e altamente polimorfico (Shi Fu-Dong et al., 2001; Shevach E.M., 2000). Pertanto nel corso della maturazione timica occorre non solo che vengano eliminati i timociti potenzialmente autoreattivi, ma anche che venga consentita la maturazione solo dei timociti il cui TCR "si adatta" alle particolari molecole MHC espresse da quell'individuo (le molecole MHC *self*).

La prima fase della selezione timica, definita di **selezione positiva**, consente la sopravvivenza solo dei timociti i cui TCR si adattano alle molecole MHC espresse dalle cellule epiteliali timiche; tutti gli altri timociti non ricevono questo segnale di sopravvivenza e muoiono per MCP.

Durante una seconda fase si verifica il processo di **selezione negativa** (simile a quello che si verifica nel midollo osseo per i linfociti B), in cui si ha l'eliminazione per MCP (delezione clonale) dei timociti con TCR specifico per peptidi *self* associati alle molecole MHC *self*.

L'insieme di questi due processi porta ad un repertorio di linfociti T tollerante nei confronti del *self* (**Figura 1**).

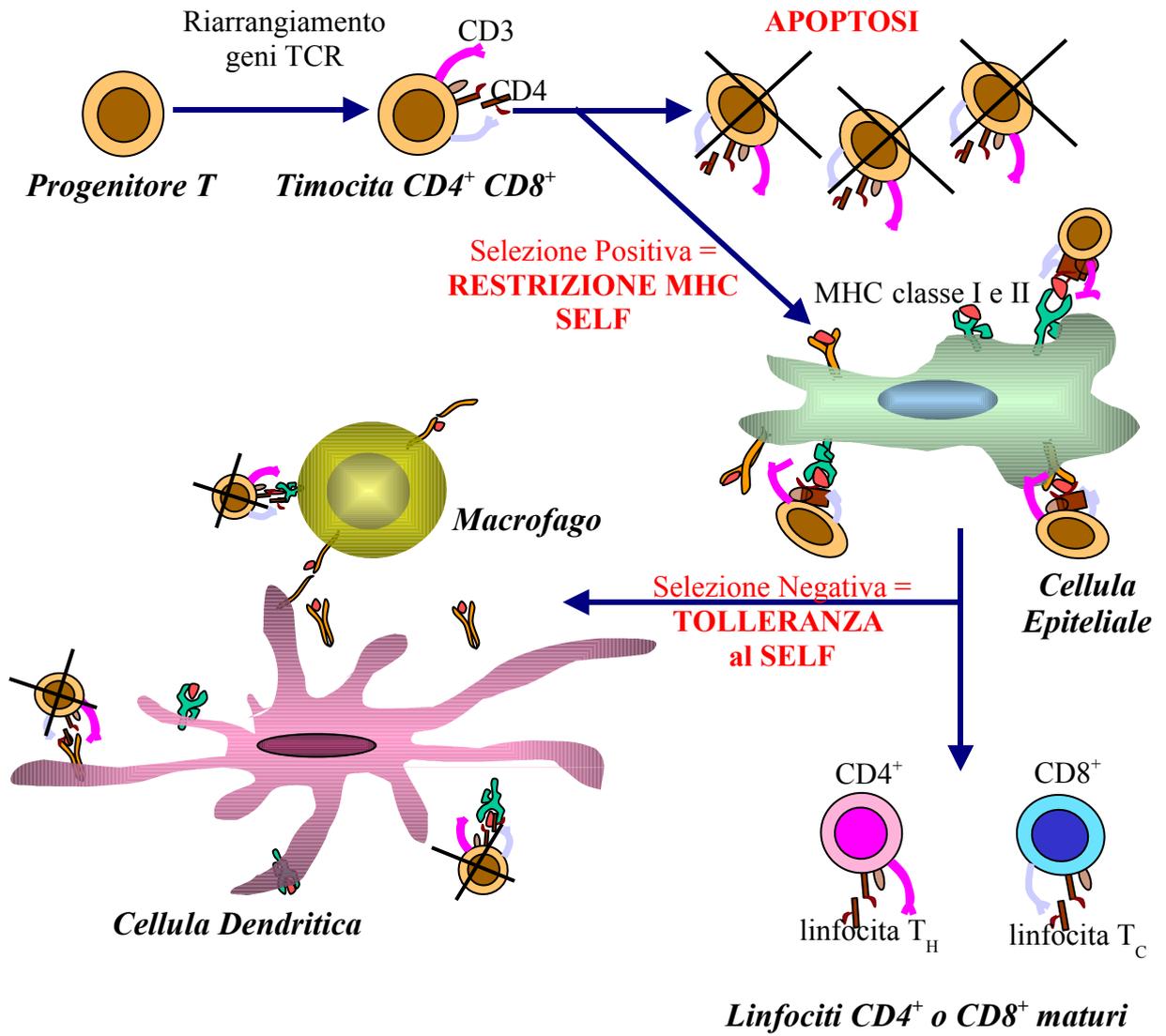


Figura 1. Selezione timica.

## 1.2 Tolleranza periferica

La delezione dei cloni linfocitari autoreattivi non si esaurisce nella selezione a livello degli organi linfatici centrali. Questo filtro, infatti, non riesce a riconoscere tutti i cloni autoreattivi poiché non tutti gli antigeni *self* sono rappresentati nel midollo osseo e nel timo. Fortunatamente, l'immissione in periferia di linfociti T potenzialmente autoreattivi non porta necessariamente allo sviluppo di malattie autoimmuni in quanto queste cellule possono ancora essere controllate da meccanismi di tolleranza periferica.

La corretta attivazione del linfocita, che porta alla sua proliferazione e differenziamento a linfocita effettore, richiede la concomitanza di due segnali: un *primo segnale* legato all'interazione del recettore per l'antigene con l'antigene e un *secondo segnale* legato all'interazione di una molecola costimolatoria del linfocita col suo ligando espresso dalla cellula presentante l'antigene (APC). Nel caso del linfocita T la molecola costimolatoria è CD28, che interagisce con i ligandi CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2) espressi dalle APC attivate.

Il riconoscimento dell'antigene in assenza del secondo segnale, porta all'inattivazione del linfocita mediante induzione di anergia o di MCP, definita in questo caso AICD (*activation-induced cell death*). Questo processo assicura che l'attivazione del linfocita sia controllata da un secondo tipo cellulare con un tipico sistema a "double check". Questo sistema fa sì che la risposta immunitaria specifica sia attivata esclusivamente in un contesto infiammatorio (ovvero di danno cellulare durante il quale le APC esprimono molecole costimolatorie), il che riduce il rischio di aggressioni contro il *self*.

Il meccanismo dell'AICD può essere suddiviso in due fasi: una fase induttiva dovuta alla stimolazione del recettore per l'antigene, e una fase effettrice che porta alla morte cellulare. Poiché molecole quali actinomicina D o cicloesimide bloccano l'AICD, si ritiene che la fase induttiva determini la trascrizione di un nuovo set di geni coinvolti nella MCP.

Tra le due fasi descritte, intervengono molecole appartenenti alle famiglie del TNF e TNFR, la cui espressione e funzione dipende fortemente dalla stimolazione del TCR.

## 1.3 Spegnimento della risposta immunitaria

La MCP svolge anche un importante ruolo nello spegnimento della risposta immunitaria al fine di "ricomprimere" la popolazione di linfociti espansi nel corso della risposta immunitaria stessa, e riportare i valori linfocitari nella norma.

Questo sistema di controllo è importante per due motivi: 1) impedisce che vi sia un progressivo accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari nel corso delle successive risposte immunitarie;

2) impedisce che questo accumulo di linfociti funzioni da fattore promuovente lo sviluppo di reazioni autoimmuni o di neoplasie linfocitarie.

L'apoptosi dei linfociti attivati nel corso della risposta immunitaria coinvolge due sistemi, uno "passivo" e uno "attivo".

1) Il sistema **passivo** è legato al venir meno degli stimoli trofici assicurati dalla risposta immunitaria. L'esaurimento dell'antigene, infatti, determina una riduzione della produzione di citochine importanti per la sopravvivenza cellulare e dell'espressione dei loro recettori da parte dei linfociti. Il calo degli stimoli di sopravvivenza causa una diminuzione dei livelli cellulari delle molecole antiapoptotiche e il conseguente innesco di MCP (morte per "cytokine withdrawal").

2) Il sistema **attivo** è invece indipendente dall'esaurimento dell'antigene ed è legato a un "orologio biologico" del linfocita effettore, che ne causa la morte dopo alcuni giorni dalla sua attivazione. Questa morte è favorita da una riattivazione del linfocita da parte dell'antigene (si parla allora di AICD) ed è legata all'azione di opportuni "recettori di morte" appartenenti alla famiglia del TNF receptor (TNFR). Questa MCP attiva ha lo scopo di controllare il rischio 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 più frequentemente coinvolti nello sviluppo di malattie autoimmuni ed è detto "mimetismo molecolare".

Le citochine esercitano un ruolo fondamentale in entrambi i tipi di spegnimento della risposta immunitaria ora descritti (Ritchie A. et Broxmeyer HE., 1999). Infatti la forma passiva può essere impedita da citochine ad azione proliferativa come IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15. Viceversa la forma attiva è favorita dalla IL-2, la cui presenza ad alte concentrazioni sensibilizza la cellula all'attività dei recettori proapoptotici riducendo l'espressione cellulare di inibitori dell'apoptosi, come FLIP o Bcl-2. L'accumulo di linfociti T attivati nei topi *knockout* per l'IL-2 o per il suo recettore può quindi essere dovuto all'effetto proliferativo mediato da altre citochine, non contrastate dall'azione proapoptotica dell'IL-2.

Le forme attiva e passiva dell'apoptosi presentano importanti differenze molecolari. L'apoptosi passiva richiede la sintesi di nuove proteine, coinvolge prevalentemente il mitocondrio ed è fortemente inibita da molecole della famiglia di Bcl-2 e da molecole correlate. Viceversa l'apoptosi attiva è indipendente dalla sintesi di nuove proteine ed è innescata dalla stimolazione di "recettori di morte" di superficie.

## 2. L'AUTOIMMUNITA'

### 2.1. Etiologia e patogenesi delle malattie autoimmuni

Agli inizi del '900 Paul Ehrlich propose che il sistema immunitario poteva reagire in modo errato dirigendo il proprio attacco contro antigeni autologhi (*self*) invece che contro antigeni estranei e producesse danni tissutali (“horrors autotopicus”).

Oggi sappiamo che 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 detto **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:

- 1) 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.
- 2) 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*.

- 3) 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 può 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 (Goldsby R.A. et al., 2000).

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 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 (LES), 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 un'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 $\gamma$  e Linfotossina, e da linfociti T citotossici (Tc). Esempi di questo tipo di malattie autoimmuni sono il Diabete Mellito di tipo I (T1DM) oppure la Sclerosi Multipla (SM) in cui i linfociti Th1 e Tc aggrediscono rispettivamente le cellule  $\beta$  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.

## 2.2 Predisposizione genetica

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 quell'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.

### 2.2.1 Associazione col sesso

Numerose malattie autoimmuni hanno una diversa frequenza nel sesso femminile e in quello maschile. Molte di esse, come il LES, la Miastenia Grave, la SM e la Sindrome di Sjögren, sono molto più frequenti nelle femmine piuttosto che nei maschi. Viceversa la Spondilite Anchilosante è più frequente nei maschi. I motivi di questa diversa suscettibilità non sono noti con certezza, ma è probabile che un ruolo centrale sia giocato dagli ormoni sessuali. Non è chiaro se gli ormoni sessuali steroidei abbiano un'azione diretta sui linfociti, tuttavia questa possibilità è suggerita dal fatto che altri steroidi, come il cortisone, hanno un effetto molto potente. Inoltre ormoni espressi diversamente nel maschio e nella femmina, come la prolattina, hanno effetto sui linfociti, come

dimostrato dal fatto che il recettore per la prolattina è espresso sia dai linfociti T che B e che la loro risposta a stimoli di attivazione è modulata in vitro da questo ormone.

E' noto che gli ormoni sessuali modulano notevolmente la risposta immunitaria durante la gravidanza indirizzando prevalentemente la risposta immune verso risposte di tipo Th2. Questo presenta due vantaggi: 1) favorisce le risposte anticorpali di tipo IgG, che sono protettive per il feto dal momento che le IgG superano la barriera placentare; 2) riduce le risposte cellulo-mediate che potrebbero invece aggredire la placenta, che è un organo non *self*. In effetti alcune forme di aborto precoce ricorrente sono state attribuite ad una eccessiva risposta Th1 o CTL contro la placenta.

In linea con queste osservazioni la gravidanza esacerba alcune malattie autoimmuni mediate da anticorpi (e quindi favorite dai Th2), come il LES, mentre attenua malattie autoimmuni mediate da cellule infiammatorie (e quindi Th1), come la SM e l'Artrite Reumatoide. E' quindi possibile che la diversa reattività immunitaria condizionata dai diversi livelli di ormoni sessuali possa essere un fattore in grado di influenzare l'innescò e l'evoluzione della risposta autoimmune nei maschi e nelle femmine.

### 2.2.2 Associazione con l'aplotipo HLA

Il più noto fattore genetico di predisposizione alle malattie autoimmuni è l'aplotipo HLA. 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 T1DM è circa 20 volte maggiore in soggetti che esprimono HLA-DR3 e DR4, rispetto a soggetti che esprimono altri alleli; la probabilità di sviluppare la SM 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.

### 3. DIABETE MELLITO DI TIPO 1 (T1DM)

Il diabete mellito di tipo 1 (T1DM) rappresenta una delle più gravi forme cliniche di diabete mellito. La malattia colpisce prevalentemente i bambini e gli adolescenti, ma non è rara la sua comparsa in età adulta e senile (Bozzato et al, 1982). L'eziologia della malattia resta ancora in gran parte sconosciuta, anche se è ampiamente accettato che l'origine del disturbo sia multifattoriale, particolarmente legato ad un'interazione tra predisposizione genetica da una parte e fattori ambientali dall'altra (Bozzato GF, 1993; Bach JF, 1994; Bosi E et al, 1997). Ne consegue lo sviluppo di una risposta autoimmunitaria, soprattutto mediata da linfociti autoreattivi citotossici e di una risposta infiammatoria organizzata da linfociti proinfiammatori Th1, che alla fine determina la distruzione delle cellule  $\beta$  insulari del pancreas (Bozzato GF, 1993). E' oggi noto che particolari combinazioni genetiche degli antigeni HLA possono contribuire al rischio di sviluppare la malattia (Todd JA, 1995), ma resta tuttora insoluto come si inneschi, e soprattutto che cosa determini, l'inizio dell'aggressione autoimmunitaria.

L'attacco autoimmune può iniziare anche diversi anni prima della manifestazione clinica della malattia. Infatti, le indagini eseguite in ampie coorti di parenti di primo grado di pazienti affetti da T1DM, di gemelli omozigoti ma discordanti per la malattia, di casi con patologia endocrina autoimmune e di bambini in età scolare, hanno dimostrato la presenza di anticorpi anti-isola pancreatica (ICA) prima della manifestazione clinica della malattia (Sepe V et al, 1997).

Successivamente sono stati individuati nuovi anticorpi anti-isola pancreatica, che sono risultati essere ulteriori marcatori sierologici predittivi della malattia. Fra questi vanno ricordati gli autoanticorpi antiinsula (IAA) (Sepe V et al, 1997), gli autoanticorpi anti-GAD (GADA) (Baekkeskov S et al, 1997) e gli autoanticorpi contro gli antigeni triptici insulari di 37 kD/40 kD (Christie MR et al, 1990); più recentemente, è stato dimostrato che questi ultimi due antigeni appartengono alla famiglia delle proteine tirosin-fosfatasi, e denominati rispettivamente IA-2 $\beta$  (o fofrina) (Hawkes CJ et al, 1996; Lu J et al, 1996) e IA-2ic (Payton MA et al, 1995; Bonifacio E et al, 1995).

Come già accennato, il rischio di sviluppare T1DM è strettamente associato a ben definiti alleli dei geni che codificano le molecole HLA, un dato confermato anche a livello molecolare (Davies JL et al, 1994; Haschimoto L et al, 1994). In linea generale, più del 90% dei bambini di razza caucasica affetti da T1DM posseggono gli aplotipi HLA-DR3 e/o HLA-DR4, mentre l'aplotipo HLA-DR2 è raramente presente e rappresenta dunque un allele protettivo; successivamente studi hanno dimostrato un'ancora più stretta associazione fra la malattia e gli alleli DQ del complesso HLA (Todd JA et al, 1987; Horn JT et al, 1988).

I fattori ambientali coinvolti nell'innescare della risposta autoimmune, che danno inizio alla distruzione delle cellule  $\beta$ , comprendono: virus (enterovirus, rosolia congenita, coxsackie) (Lammi N et al, 2005; Robles DT et al, 2001), tossine (nitrosamine) (Helgason T et al, 1981) e alimenti (proteine del latte, cereali, glutine) (Akerblom HK et al, 2002; Virtanen SM et al, 2000; Vaarala O et al, 1999; Thorsdottir I et al, 2003; Norris JM et al, 2003).

### *3.1 Modello animale di diabete mellito autoimmune*

Dal momento che i sintomi del diabete appaiono tardivamente durante il processo di distruzione delle cellule  $\beta$ , risulta essere difficoltoso lo studio delle fasi iniziali della malattia nell'uomo; per questa ragione, soprattutto negli ultimi anni, lo studio di modelli animali si è reso sempre più indispensabile.

Uno dei modelli animali più comunemente studiato di diabete spontaneo è rappresentato dai topi diabetici non-obesi (NOD).

Nei topi NOD, infiltrazioni linfocitarie determinano sviluppo di insuliti nelle isole pancreatiche, seguite da distruzione delle cellule  $\beta$ , diminuzione di insulina e iperglicemia (Helen E. Thomas, 2000). Insuliti benigne o non-distruttive compaiono dopo lo svezzamento in tutti i topi NOD. Le cellule presentanti l'antigene (APC), come macrofagi e cellule dendritiche, appaiono precocemente, seguite da linfociti T  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  e linfociti B (Jansen A et al, 1994). Queste insuliti benigne sono generalmente localizzate intorno alle insule (peri-insula) e rappresentano un primo stadio che si ritiene essere il momento in cui la tolleranza verso antigeni delle cellule  $\beta$  viene persa (Andre I et al, 1996). In un secondo stadio, queste insuliti invadono le insule (intra-insula) divenendo distruttive e determinando la comparsa dei sintomi del diabete. Questo accade dopo circa sei mesi di vita in circa l'80% delle femmine e il 15% dei maschi.

Non è ancora molto chiaro se le cellule  $\beta$  vengano gradualmente distrutte durante la fase pre-clinica o rapidamente subito prima della comparsa di iperglicemia (Helen E. Thomas, 2000).

Ci sono a tutt'oggi evidenze del fatto che le cellule  $\beta$  vengano distrutte tramite meccanismi apoptotici (Mauricio D. et al, 1998), anche se altri meccanismi sembrano essere coinvolti.

Molti mediatori apoptotici sono presenti nelle lesioni insuliniche dei tipi NOD; questi includono fattori prodotti da linfociti T, macrofagi o cellule insulari quali perforina, citochine, radicali liberi e ligandi di morte. (Helen E. Thomas, 2000).

### 3.2 Meccanismo di distruzione delle cellule $\beta$

Le cellule presentanti l'antigene (APC), come macrofagi e cellule dendritiche, appaiono precocemente, seguite da linfociti T CD4 e CD8 e linfociti B (Jansen A et al, 1994). La distruzione cellulare T-mediata è modulata dal rilascio di molecole citotossiche che includono citochine, granzima B o perforina, o direttamente da segnali di morte cellulare attraverso il meccanismo Fas-mediato.

Linfociti T CD4 e CD8 attivati agiscono all'unisono nell'attivazione dell'apoptosi delle cellule  $\beta$ . La morte cellulare programmata si compie tramite l'attivazione della cascata caspasi che a sua volta è innescata da una serie di meccanismi alternativi quali l'interazione di Fas con il suo ligando, l'azione di ossido nitrico e radicali liberi dell'ossigeno e dalla distruzione della membrana cellulare ad opera di perforina e granzima B prodotti da linfociti T citotossici (**Figura 2**). (Eiji K et al, 2004)

Diverse citochine sono coinvolte nell'induzione o nell'inibizione della distruzione delle cellule  $\beta$  nel T1DM.

La distruzione cellulare è indotta da linfociti T CD4 Th1 e da citochine di tipo 1, come INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-18. Al contrario, l'inibizione del danno cellulare avviene ad opera di citochine Th2 e Th3, come IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- $\beta$  ( Mosmann TR et al, 1989).

Queste citochine creano un bilanciamento immunologico regolatorio e generalmente si ritiene che il T1DM sia una malattia a dominanza Th1.

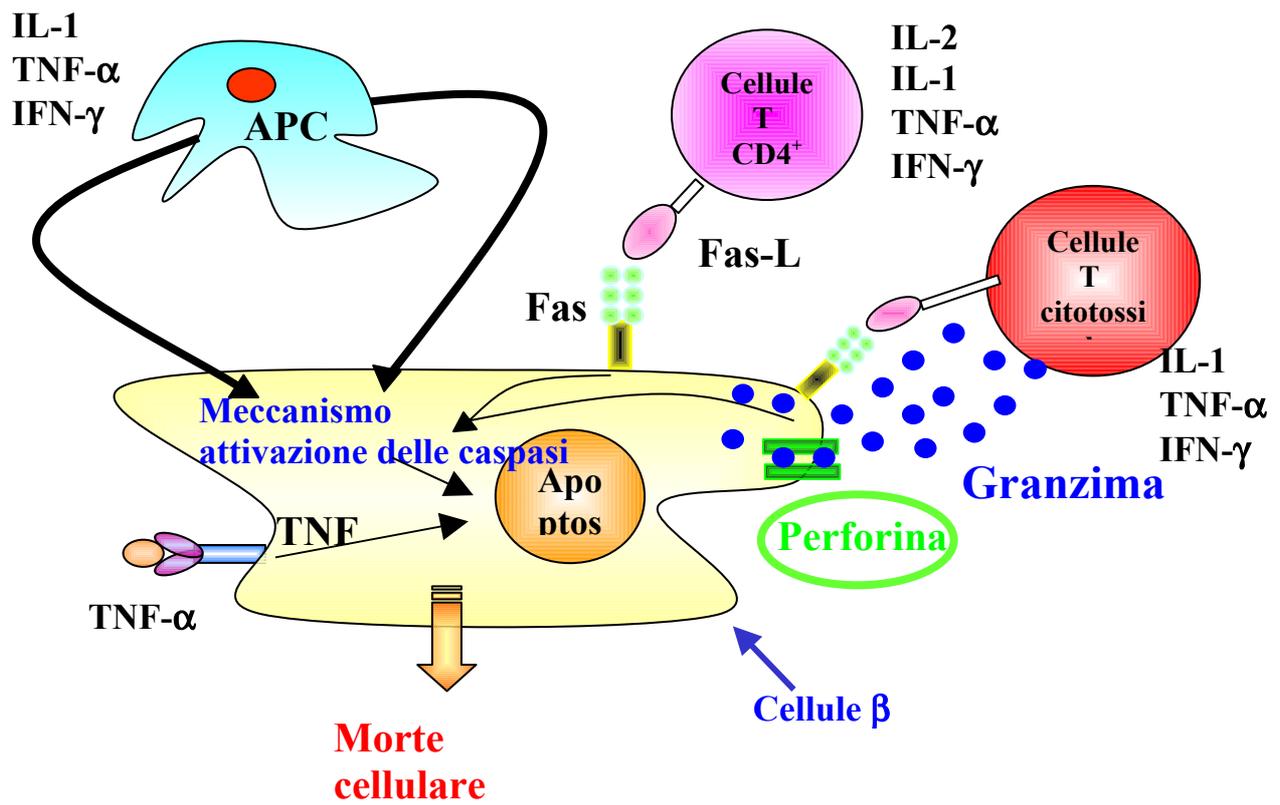


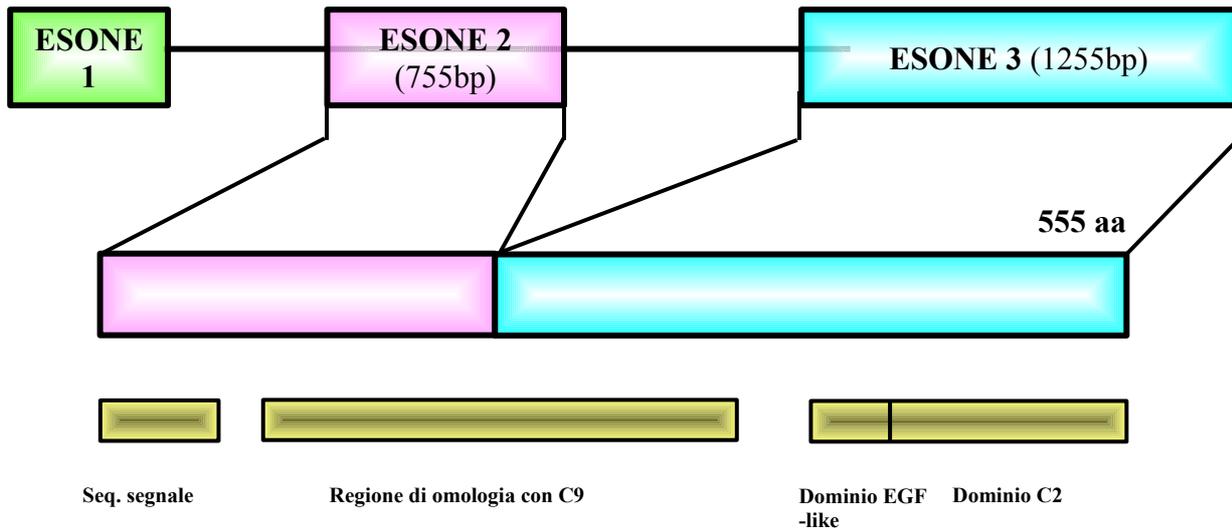
Figura 2. Meccanismo di distruzione delle cellule  $\beta$  nel T1DM

## 4. PERFORINA

Perforina è una delle principali molecole nell'apoptosi granzima-mediata, anche se a tutt'oggi si ritiene che non sia solamente implicata nella creazione dei pori transmembrana nella cellula bersaglio. Infatti, le molecole di granzima sono in grado di 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). Perforina potrebbe perciò avere un ruolo nel rilascio dei granzimi dal compartimento endocitico della cellula bersaglio (Smyth et al. 2005).

### 4.1 *Struttura e funzione*

Il gene umano di perforina, localizzato sul cromosoma 10q22 (Lichtenheld et al., 1989), è costituito da tre esoni, due dei quali (esone 2 e 3) codificanti per una proteina di 555 aminoacidi. Essa è suddivisa in diversi domini: la sequenza segnale (21aa), seguita da una regione di 300aa con una forte omologia con la proteina C9 del complemento, da 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). La proteina contiene due siti di N-glicosilazione. Viene sintetizzata come precursore inattivo: una volta processato nel carbossiterminale, rilascia circa 20 aminoacidi e si trasforma nella forma attiva (Uellner et al., 1997) (**Figura 3**). 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.



**Figura 3. Struttura del gene, della proteina e dei domini strutturali di perforina.**

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.

Quando perforina viene rilasciata, si lega alla membrana della cellula bersaglio e forma dei piccoli pori (15nm di diametro). Questi pori sono simili a quelli formati dal complemento. Alcuni studiosi sostengono che i granzimi, rilasciati dai granuli citotossici insieme a perforina, passino attraverso i pori nel citoplasma della cellula bersaglio, inducendone così l'apoptosi (Liebermann et al. 2003). 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.

#### 4.2 Deficit di perforina nell'uomo: la linfoistiocitosi emofagocitica familiare (FHL)

La sindrome emofagocitica (HPS) è una patologia caratterizzata da febbre alta, epatosplenomegalia, citopenia, alti livelli di ferritina, aumentata proliferazione e attivazione di macrofagi con emofagocitosi attraverso il sistema reticoloendoteliale. La HPS può essere primaria, come si osserva nella linfoistiocitosi emofagocitica familiare (FHL), nella sindrome linfoproliferativa X-linked (XLP), nella sindrome di Chediak-Higashi (CHS) e in quella di Griscelli (GS), oppure secondaria a infezioni, malattie autoimmuni o farmaci (sindrome di ipersensività) (Larroche et al. 2004).

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- $\gamma$ , 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- $\gamma$  e IL-12, i cui livelli correlano positivamente con il progredire della malattia (Takada et al. 2001, 2003). Anche i livelli di citochine pro-infiammatorie, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  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).

Nei pazienti con HPS si rilevano inoltre elevati livelli di *Macrophage Colony Stimulating Factor* (M-CSF), così come un'aumentata espressione di *Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$*  (MIP-1 $\alpha$ ), probabilmente come conseguenza della produzione di IL-18 (Akashi et al. 1994; Teruya-Feldstein et al. 1999; Takada et al. 2001).

La FHL è una malattia autosomica recessiva che colpisce circa 1/50000 nati. E' caratterizzata da una sindrome da 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 di 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, tra cui, 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 rendere elevato il 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). *Munc 13-4* è importante per la fusione dei granuli alla membrana cellulare.

Stepp et al. dimostrarono per primi che il gene di perforina, localizzato sul cromosoma 10q21, era responsabile di FHL in molti pazienti. Questi pazienti presentano mutazioni bialleliche che determinano la bassa espressione o la totale assenza della proteina nelle cellule citotossiche.

## 5. OSTEOPONTINA

### 5.1 Struttura

Osteopontina (OPN) è una fosfoproteina di 60 KD codificata da un gene multiallelico localizzato nell'uomo sul cromosoma 4, q21-q25, formato da 7 esoni e 6 introni (Patarca et al., 1993). La sua espressione è basale e costitutiva nel tessuto epiteliale ed osseo, mentre nelle cellule della muscolatura liscia, nei macrofagi e negli endoteli è iper espressa a seguito di eventi infiammatori. Questa proteina favorisce in vitro l'adesione di linfociti T e macrofagi attivati umani e murini, mentre in vivo provoca l'accumulo di macrofagi nei siti in cui viene iniettata. OPN non viene prodotta dai monociti ma la sua espressione è rapidamente indotta quando i monociti sono stimolati a differenziare in macrofagi.

OPN possiede la sequenza tripeptidica "Arginina-Glicina-Aspartato" (RGD), caratteristica delle proteine della matrice extracellulare (ECM) e delle proteine del siero (come la fibronectina, la vitronectina, il collagene e il fibrinogeno) (Rouslati E. et al, 1987). Il suddetto dominio permette alla proteina di interagire con vari recettori integrinici, come  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$ ,  $\alpha v$  ( $\beta 1, \beta 3, \beta 5$ ) (Bayless KJ et al, 2001; Barry ST et al, 2000; Smith LL et al, 1999; Duong LT et al, 1998; Smith LL et al, 1996; Wong A et al, 1996; Liaw L et al, 1995).

Tale legame è responsabile dei meccanismi di adesione di linfociti T e macrofagi.

Gli effetti di OPN sono mediati da diversi recettori, incluse le integrine sopraccitate e isoforme del CD44<sub>v6-7</sub> (Mazzali M et al, 2002; Denhardt DT et al, 2001; Yokasaki Y et al, 2000; O'Regan A et al, 2000; Katagiri YU et al, 1999); quest'ultime sembrano mediare la funzione chemotattica di osteopontina e ridurre l'espressione di IL-10 e IL-4 (Weber GF et al., 1996), mentre le integrine mediano l'adesione di cellule B, piastrine, osteoclasti, cellule del muscolo liscio e l'aumentata espressione di IL-12 da parte dei macrofagi; entrambi i recettori polarizzano comunque le cellule T verso una risposta di tipo-1.

OPN è espressa in diverse forme funzionali, che si differenziano o a livello trascrizionale (splicing alternativo) e post-trascrizionale (fosforilazione e glicosilazione), o in seguito a varie scissioni proteolitiche operate da trombina o metalloproteasi della matrice (MMPs), soprattutto la MMP-3 e la MMP-7. In particolare i frammenti generati dalla trombina (trombin-OPN) e dalle MMPs (MMP-OPN) sembrano acquisire nuove funzioni rispetto alla proteina intera (Agnihotri R et al, 2001; Philip Sm et al, 2001; Williams S et al, 1999).

Sono stati identificati tre cDNA di OPN in seguito a splicing alternativo: OPNa di 945bp che codifica per la proteina intera, OPNb di 903 bp che perde 14 aminoacidi dell'esone 5 e OPNc di

864bp che perde 28 aminoacidi dell'esone 4; in particolare quest'ultima isoforma è maggiormente presente nelle cellule maligne del glioma (Young MF et al, 1990).

OPN è anche ricca di residui di acido aspartico e può essere abbondantemente glicosilata. La componente glicidica è rappresentata da un N-glicoside e cinque o sei O-glicosidi, mentre quella fosforica da dodici fosfoserine e una fosfotreonina.

## 5.2. Funzioni

Sono molti i processi fisiologici e patologici in cui OPN sembra coinvolta: i movimenti e la migrazione delle cellule, il rimodellamento vascolare, il riassorbimento osseo, la regolazione della produzione di ossido nitrico (NO) e la formazione di metastasi tumorali (Denhart DT et al, 1998; McCauley LK., 2001).

Inoltre OPN è coinvolta nell'infiltrazione macrofagica e linfocitaria in risposta a diversi stimoli patologici in vivo, è espressa da istiociti nei granulomi di varia provenienza (inclusa tubercolosi e sarcoidosi (Carlson I et al, 1997), ed è direttamente coinvolta nella formazione e nella calcificazione delle placche dell'arteriosclerosi (O'Brien ER et al, 1994).

OPN gioca un ruolo importante nel favorire lo sviluppo di una risposta immunitaria di tipo-1 ed è stata chiamata, inizialmente, *Eta-1* (*early T lymphocyte activation-1*).

Essa svolge quindi la funzione di citochina per i linfociti T, che la producono nelle prime fasi della loro attivazione (O'Regan AW et al, 200; Katagiri Y et al, 1995).

OPN aumenta l'espressione delle citochine Th1 e inibisce quella delle Th2 (O'Regan AW et al, 200; Katagiri Y et al, 1995; Ashkar S et al, 2000).

Nel topo OPN costimola i macrofagi, attivati da lipopolisaccaride, a produrre IL-12 ed inibisce la produzione di IL-10. In linea con quest'osservazione, topi *knock out* per OPN rispondono ad infezioni normalmente caratterizzate da una risposta di tipo Th1 con una ridotta produzione di IL-12 e una aumentata produzione di IL-10 (Reinholt FP et al, 1990; O'Regan AW et al, 2000; Yoshitake H et al, 1999; Denhardt DT et al, 2001).

OPN indirizza quindi lo sviluppo della risposta immunitaria verso una risposta Th1 con produzione di citochine proinfiammatorie (IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e attività helper per i macrofagi; contariamente ai Th1, i Th2 producono citochine con funzione helper sui linfociti B, quali IL-4, -5, -6 e -10.

La scelta differenziativa dei linfociti Th è guidata dalle citochine presenti nel microambiente in cui avviene l'attivazione. Ad esempio, un evento fondamentale per la differenziazione a Th1 è la produzione di IL-12 da parte dei macrofagi, mentre la produzione di IL-10 inibisce questo processo

(O'Regan A et al, 2000; Masutani K et al, 2001; Adler B et al, 2001; Akahoshi M et al, 1999; Nagai S et al, 2001).

Sulla base di precedenti studi sulle caratteristiche immunologiche dei pazienti con ALPS, si è visto che essi presentano una risposta preferenziale di tipo Th2 con ridotta produzione di IL-2 e IFN- $\gamma$  e aumentati livelli di IL-4 e IL-5. A questo va aggiunto che in questi pazienti i livelli di IL-10 sono notevolmente aumentati a dispetto di quelli di IL-12.

In definitiva, IL-10 altera il bilancio Th1/Th2 svolgendo un ruolo da antagonista nello sviluppo dei Th1 favorendo indirettamente la linea Th2.

### *5.3 Ruolo nell'autoimmunità*

I ruoli svolti da OPN nello sviluppo di autoimmunità nell'uomo sono molteplici: OPN stimola infatti i linfociti T a differenziarsi, proliferare e aumenta l'espressione, da parte dei linfociti stessi, di INF- $\gamma$  e di CD40L con conseguente espressione di IL-12 da parte delle PBMC.

Lo studio svolto su topi transgenici che producono elevati livelli di OPN (OPN<sup>+/+</sup>) ha evidenziato un accumulo nella cavità peritoneale di un particolare tipo di linfociti denominati B1, che sono stati in passato associati con la produzione di autoanticorpi, ipergammaglobulinemia e elevati livelli sierici di autoanticorpi (Patarca R et al, 1993; Denhardt DT et al, 2001; O'Regan A et al, 2000; Masutani K et al, 2001; Adler B et al, 2001; Akahoshi M et al, 1999; Nagai S et al, 2001; Iizuka J et al, 1998).

Chabas e colleghi hanno recentemente dimostrato aumentati livelli di mRNA per OPN nelle placche di pazienti affetti da sclerosi multipla (SM) e di topi affetti da encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE), il modello murino della SM (Chabas D et al, 2001).

## SCOPO DEL LAVORO

Nel nostro laboratorio abbiamo studiato recentemente il coinvolgimento di variazione del gene di perforina nello sviluppo della Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS), rara malattia autoimmune ereditaria causata da difettiva funzionalità di Fas.

E' stato dimostrato che la sostituzione nucleotidica A755G che cade nell'esone 3 di perforina (che determina la variazione N252S) è un fattore di rischio allo sviluppo dell'ALPS, mentre la variazione C272T nell'esone 2 (che conduce alla sostituzione aminoacidica A91V) è risultata essere un fattore di suscettibilità allo sviluppo della DALD (variante incompleta dell'ALPS).

Poiché è noto che perforina rappresenta una delle molecole coinvolte nel meccanismo di distruzione delle cellule  $\beta$  del pancreas che si assiste nel Diabete Mellito di Tipo 1, abbiamo deciso di valutare se le due variazioni riscontrate essere significative nell'ALPS/DALD potessero costituire fattori di rischio anche per lo sviluppo di una malattia autoimmune più comune come il T1DM.

## MATERIALI E METODI

### *1-PAZIENTI*

Nella ricerca di polimorfismi e mutazioni del gene di perforina sono stati analizzati pazienti con T1DM (375 nello studio della variazione N252S e 354 nello studio della A91V) e 816 controlli sani, etnicamente correlati, provenienti dal Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università del Piemonte Orientale

Per lo studio del gene di osteopontina sono stati analizzati 368 pazienti con T1DM e 688 controlli sani.

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.

### *2-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 di una soluzione NaCl 6M. Le proteine precipitate sono state rimosse mediante centrifugazione per 20 min a 2500 rpm.

Al surnatante si è aggiunto etanolo assoluto in rapporto 1:1 vol/vol con il surnatante stesso per precipitare il DNA. La matassa di DNA formata 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).

### 3-MISURAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI ALLO SPETTROFOTOMETRO

La lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro, effettuata ad una lunghezza d'onda di 260 nm, ha permesso di valutare la concentrazione degli acidi nucleici conoscendo le seguenti relazioni:

50 µg/ml corrispondono a 1 O.D.<sub>260 nm</sub> per il DNA

40 µg/ml corrispondono a 1 O.D.<sub>260 nm</sub> per l'RNA

Un'ulteriore lettura a 280 nm viene utilizzata per valutare la purezza del DNA o dell'RNA; il rapporto ottimale OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> per il DNA è pari a 1,8, mentre per l'RNA è pari a 2.

### 4-PCR ( Polymerase Chain Reaction)

L'esone 2 e 3, codificanti il gene perforina, e la regione corrispondente al 3' UTR di OPN, sono stati amplificati, mediante l'utilizzo della Taq polimerasi (Invitrogen), da campioni di DNA genomico estratto da pazienti e da controlli sani.

La reazione di PCR è stata allestita con 100-300 ng di DNA utilizzando i primers descritti in **Tabella 1**.

	<b>PRIMERS</b>	<b>MgCl<sub>2</sub></b>
<b>Perforina EX-2</b>	F:5'-ccctccatgtgccctgataatc-3' R:5'-aagcagcctccaagtttgattg-3'	1 mM
<b>Perforina EX-3</b>	F:5'-ccagtcctagttetgccacttac-3' R:5'-gaacccctcagccaagcatac-3'	2 mM
<b>OPN 3'UTR</b>	F:5'-tgctttatagcaaaatgaaaag-3' R:5'-ccaccaaattcttattacattcaa-3'	3 mM

**Tabella 1. Condizioni di PCR degli esoni 2 e 3 di perforina e del 3'UTR di OPN (F, forward; R, reverse).**

La miscela di reazione è composta dal 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 reazioni di PCR necessitano per avvenire di MgCl<sub>2</sub>: esso era concentrato 1 mM nella reazione di amplificazione dell'esone 2, 2 mM per l'esone 3 di perforina e 3mM per il 3'UTR di OPN. Le condizioni di reazione sono le seguenti:

### **Perforina Esone-2:**

94°C 5'  
94°C 30" }  
65°C 30" } 35 cicli  
72°C 1' }  
72°C 7'

### **Perforina Esone-3**

94°C 5'  
94°C 30" }  
60°C 30" } 35 cicli  
72°C 1'3" }  
72°C 7'

### **OPN 3' UTR**

94°C 5'  
94°C 20" }  
63°C 20" } 35 cicli  
72°C 30" }  
72°C 7'

## *5- ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO*

Il gel è stato preparato sciogliendo l'agarosio (1,5%) in Tampone Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1% contenente bromuro d'etidio. L'esposizione agli UV del gel permette il rilevamento del DNA grazie alla fluorescenza emessa dall'etidio bromuro incorporato dal campione.

## *6- SEQUENZIAMENTO AUTOMATICO*

I prodotti di PCR, sono stati purificati dall'eccesso di primers e di nucleotidi non incorporati, utilizzando gli enzimi EXO e SAPI (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 ottenute 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 µl, sono stati addizionati al DNA purificato, 2 µl

di BigDye Sequencing Buffer (in dotazione con il kit) , il primer (3,2  $\mu\text{M}/\mu\text{l}$ ). La reazione di sequenziamento prevede l'utilizzo del seguente programma:

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

Il prodotto della reazione è stato purificato, al fine di eliminare gli oligonucleotidi non incorporati, mediante il kit Montage SEQ<sub>96</sub> Sequencing Reaction Cleanup (Montage). 5  $\mu\text{l}$  del purificato sono stati addizionati a 10  $\mu\text{l}$  di formammide, denaturati (3' a 95°C), e caricati su piastra ottica per la successiva analisi al sequenziatore.

#### *7-ANALISI STATISTICA*

L'analisi della distribuzione dei polimorfismi e degli aplotipi nelle popolazioni è stata fatta con il test del  $\chi^2$ . I valori di  $p$  sono stati calcolati tenendo conto di tutti i parametri necessari. La stima della massima probabilità delle frequenze degli aplotipi è stata calcolata con il programma Arlequin ver 1.1 (Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland).

## RISULTATI

### *I-Ricerca di variazioni nel gene di perforina in pazienti con T1DM*

In letteratura sono noti 6 polimorfismi (SNPs) del gene di perforina, 3 dei quali sono localizzati nell'esone 2 (C272T, G435A e A462G) e gli altri 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). Di queste variazioni, 4 sono silenti: esse infatti cambiano la terza base della tripletta e non variano l'amminoacido per cui la tripletta codifica. Al contrario, 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 nel codone 252.

NUCLEOTIDE	AMINOACIDO	REFERENZE
C272T	A91V	Clementi et al. 2002; Busiello et al. 2004
G435A	V145V	Molleran Lee et al 2004
A462G	A154A	Molleran Lee et al 2004
A755G	N252S	Stepp et al. 1999; Feldmann et al. 2002
C822T	A274A	Molleran Lee et al 2004
T900C	H300H	Molleran Lee et al 2004

**Tabella 2. Polimorfismi e mutazioni del gene di perforina descritti in letteratura.**

In studi precedenti abbiamo dimostrato che le tre variazioni G435A, A462G e A755G costituiscono un aplotipo, e vengono quindi ereditate insieme. Questo aplotipo rappresenta un allele raro ed è stato pertanto individuato sempre in eterozigosi.

In questo studio ci siamo focalizzati sui due polimorfismi di perforina che determinano cambiamento aminoacidico: C272T (A91V) nell'esone 2 e A755G (N252S) nell'esone 3.

### *1.1 Analisi della variazione A91V*

Lo studio della variazione A91V è stato condotto su 354 pazienti affetti da T1DM e 816 controlli; di seguito sono indicate le frequenze genotipiche e alleliche della variazione nelle due popolazioni analizzate (**Tabella 3 e 4**).

GENOTIPO	PAZIENTI T1DM		CONTROLLI	
	N	%	N	%
<b>A91A</b>	335	94.6	744	91.2
<b>A91V</b>	17	4.8	69	8.44
<b>V91V</b>	2	0.6	3	0.36
<b>NS</b>				

**Tabella 3.** Frequenze genotipiche della sostituzione A91V.

ALLELE	PAZIENTI T1DM		CONTROLLI	
	N	%	N	%
<b>A</b>	687	97	1557	95.4
<b>V</b>	21	3	75	4.6
<b>NS</b>				

**Tabella 4.** frequenze alleliche della sostituzione A91V.

La distribuzione genotipica della variazione non devia significativamente dall'equilibrio di Hardy-Weinberg nelle due popolazioni.

La variazione A91V è stata individuata in 19 pazienti T1DM (2 in omozigosi, 17 in eterozigoti) e in 72 controlli (3 in omozigosi, 69 in eterozigoti). La sua frequenza allelica non è risultata significativamente diversa nei due gruppi.

### 1.2 Analisi della variazione N252S

Lo studio della variazione N252S è stato condotto su 375 pazienti T1DM e 816 controlli; le frequenze genotipiche ed alleliche sono riportate di seguito (**Tabella 5 e 6**):

GENOTIPO	PAZIENTI T1DM		CONTROLLI	
	N	%	N	%
<b>N252N</b>	364	97	814	99.75
<b>N252S</b>	11	3	2	0.25
<b>S252S</b>	0	0	0	0
<b>OR=12.30 CI: 2.57-80.7 p=0.0001094</b>				

**Tabella 5. Frequenze genotipiche della variazione N252S.**

ALLELE	PAZIENTI T1DM		CONTROLLI	
	N	%	N	%
N	739	98.5	1630	99.87
S	11	1.5	2	0.13

**Tabella 6. Frequenze alleliche della variazione N252S.**

La variazione N252S è stata individuata in 11 pazienti T1DM e 2 controlli, in entrambe le popolazioni solo in eterozigosi.

La frequenza allelica è risultata essere significativamente più alta nei pazienti con T1DM, rispetto ai controlli e conferisce un OR= 12.3 (95% CI: 2.57-80.7; p=0.0001094).

Anche in questo caso, come per la variazione A91V, entrambe le popolazioni soddisfano l'equilibrio di Hardy-Weinberg.

### *2-Studio dei polimorfismi del gene di osteopontina*

In letteratura sono state descritte undici variazioni nucleotidiche del tipo SNPs contenute nel gene di OPN; una si trova nell'esone VI e dieci nell'esone VII (tra queste ultime, due sono nella regione codificante del gene e otto nella regione dell'estremità -3' non tradotta 3'UTR)

In studi precedenti condotti su pazienti ALPS, abbiamo dimostrato che quattro delle undici variazioni nucleotidiche SNPs, corrispondenti alle posizioni +282 T>C (esone VI), +750 C>T (esone VII, regione codificante), +1083 A>G (esone VII 3'UTR), +1239 A>C (esone VII 3'UTR) (la suddetta numerazione è riferita al cDNA considerando l'adenina della tripletta di inizio ATG come +1) risultano essere in completo linkage disequilibrium ( $p < 10^{-5}$ ), e originano tre combinazioni maggiormente probabili, che sono state denominate aplotipo-A, -B e -C (**Tabella 7**).

Questa analisi è stata condotta mediante l'utilizzo del programma Arlequin e facendo una stima della frequenza attesa per le singole combinazioni.

	+282	+750	+1083	+1239
<b>Aplotipo – A</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
<b>Aplotipo – B</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>C</b>
<b>Aplotipo – C</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>C</b>

**Tabella 7. Aplotipi di osteopontina originati dai quattro SNPs.**

Poichè è stato dimostrato un coinvolgimento dei polimorfismi di OPN appena descritti in malattie autoimmuni come ALPS, LES, SM, abbiamo deciso di ricercare le stesse variazioni in soggetti affetti da T1DM. Abbiamo sequenziato il DNA genomico, corrispondente alla regione compresa tra esone VI ed esone VII, in 368 pazienti con T1DM e 688 controlli sani di simile origine geografica. La distribuzione complessiva di aplotipi e genotipi è risultata in equilibrio di Hardy-Weinberg sia nei controlli che nei pazienti.

APLOTIPO	PAZIENTI T1DM		CONTRILLI		STATISTICA		
	N	%	N	%	p	OR	CI
<b>A</b>	467	63.5	977	71	0.0004532	0.71	0.58-0.86
<b>B</b>	71	9.5	75	5.5	0.0004121	1.85	1.3-2.63
<b>C</b>	198	27	324	23.5	0.0988292	1.19	0.97-1.47
					<b>Overall= 0.00010114</b>		

**Tabella 8. Frequenze aplotipiche.**

GENOTIPO	PAZIENTI T1DM		CONTROLLI		STATISTICA		
	N	%	N	%	P	OR	CI
<b>AA</b>	145	39.1	352	50.9	<b>0-0003388</b>	<b>1.61</b>	<b>1-24-2-1</b>
<b>AB</b>	46	12.5	59	9	NS		
<b>AC</b>	131	35.7	214	31	NS		
<b>BB</b>	4	1	1	0.1	NS		
<b>BC</b>	17	4.6	14	2	<b>0.0292864</b>	<b>2.33</b>	<b>1.08-5.06</b>
<b>CC</b>	25	6.8	48	7	NS		
					<b>Overall= 0.00047999</b>		

**Tabella 9. Frequenze genotipiche.**

La frequenza dell'aplotipo-A nei pazienti con T1DM è risultata inferiore rispetto ai controlli (63.5% vs 71%), mentre quella per gli aplotipi –B e –C è risultata superiore (rispettivamente 9.5% vs 5.5%

per aplotipo -B e 27% vs 23.5% per -C). Inoltre, gli aplotipi B e C conferiscono un rischio di 1.5 volte superiore di sviluppare T1DM (OR=1,4 CI: 1.16-1.71, p=0.0004532).

## DISCUSSIONE

Perforina è contenuta nei granuli di linfociti citotossici (CTL) e delle cellule Natural Killer (NK) e svolge un ruolo fondamentale nella citotossicità cellulo-mediata.

Mutazioni bi-alleleliche del gene di perforina sono associate al 30% dei casi di linfoistocitosi emofagocitica familiare (FHL), rara immunodeficienza congenita (Kadano H and Cohen JI, 2004). Recentemente, abbiamo dimostrato che due variazioni di perforina (N252S, A91V), di per se incapaci di causare l'FHL, possono agire come fattori di suscettibilità allo sviluppo della Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS), rara malattia autoimmune ereditaria causata da difettiva funzionalità di Fas (Clementi et al., 2006 in the press).

Nei pazienti ALPS la funzionalità di Fas è ridotta a causa di mutazioni ereditarie deleterie che colpiscono geni coinvolti in questo sistema (Fas, Fas-L, caspasi-10, caspasi-8). La penetranza di queste mutazioni è incompleta e questo suggerisce che altri fattori complementari sono probabilmente coinvolti nello sviluppo della malattia.

Abbiamo dimostrato che la mutazione N252S di perforina è un fattore di rischio allo sviluppo dell'ALPS, mentre la variazione A91V è risultato un fattore di suscettibilità allo sviluppo della DALD (variante incompleta dell'ALPS).

Nell'ALPS/DALD, alterazioni di Fas e perforina potrebbero cooperare riducendo da un lato la capacità del sistema immunitario di eliminare le infezioni virali, dall'altro determinando un difettivo meccanismo di spegnimento della risposta immunitaria stessa; infatti entrambe le molecole vengono utilizzate dai CTL per uccidere cellule infettate da virus, inoltre i linfociti attivati esprimono elevati livelli di Fas e sono sottoposti alla regolazione negativa da parte di linfociti o altri tipi cellulari che esprimono FasL.

In studi precedenti, abbiamo dimostrato che difetti ereditari della funzionalità di Fas possono anche predisporre allo sviluppo di comuni malattie autoimmuni quali Sclerosi Multipla e T1DM. (omi C. et al, 2000; De Franco S. et al, 2001)

Scopo di questo lavoro è stato quindi quello di valutare se variazioni di perforina potessero giocare un ruolo, non solo nello sviluppo dell'ALPS, ma anche in quello del T1DM.

Abbiamo ricercato la variazione N252S, in 375 pazienti T1DM e 816 controlli. La mutazione è stata identificata in 11 pazienti T1DM e 2 controlli, solo in eterozigosi. La sua frequenza è risultata significativamente più elevata nei pazienti T1DM (1.5%) rispetto ai controlli (0.13%); la sua presenza aumenta quindi il rischio di sviluppare T1DM di circa 12 volte (OR=12.30 CI: 2.57-80.7 p=0.0001094).

La 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. Tale variazione è già stata descritta da altri gruppi di ricerca in pazienti affetti da FHL, ma sempre associata a altre mutazioni a carico dell'altro allele di perforina, per cui la sua rilevanza funzionale è argomento dibattuto. Infatti:

- l'asparagina in posizione 252 è presente solo nel gene umano di perforina, roditori e uccelli hanno rispettivamente un acido aspartico e un acido glutammico (PredictProtein, EMBL-Heidelberg). Questo suggerisce che perforina possa sopportare delle sostituzioni semi-conservative in questa posizione;

- la mutazione N252S sembra essere associata ad una normale attività delle cellule NK: infatti, tutte le mutazioni *missense* in questa posizione (non solo D252S, ma anche D252N e D252E), generate in laboratorio, mantengono apparentemente la stessa attività della molecola *wild-type* (Voskoboinik et al. 2005)

Queste osservazioni suggeriscono che da un lato la mutazione N252S possa essere implicata nella stabilità della proteina, analogamente a quanto dimostrato per la variazione A91V (anch'essa associata a FHL), dall'altro lato che questo effetto sia attivo solo nei primi anni di vita e sia successivamente superato grazie all'attivazione di qualche meccanismo di compenso.

La variazione A91V, che altera la conformazione della proteina, riducendone l'attivazione proteolitica e aumentandone la degradazione (Trambas et al. 2005, Voskoboinik et al. 2005), è stata identificata in 19/354 pazienti con T1DM (17 pazienti in eterozigosi, 2 in omozigosi) e 72/816 controlli. La sua frequenza (3% nei pazienti contro il 4.6% della popolazione di controllo), mostra una differenza non significativa.

Altre quattro variazioni nucleotidiche sono state investigate, ma non sono state valutate dal momento che non determinano cambiamento aminoacidico. Due di esse (G435A e A462G) sono in perfetto linkage disequilibrium con la sostituzione A/G in posizione 755 (N252S) e sono state infatti individuate negli 11 pazienti diabetici portatori della mutazione.

In un lavoro precedente (Clementi R. et al, 2006), abbiamo riscontrato che nei pazienti ALPS/DALD la variazione A91V ma non la N252S di perforina presenta un effetto cooperativo con particolari polimorfismi del gene di osteopontina, associati ad un'aumentata produzione della proteina, citochina coinvolta sia nella risposta immune cellulo-mediata che nell'inibizione dell'apoptosi linfocitaria.

Un dato interessante è emerso dallo studio dei singoli polimorfismi del gene di osteopontina nei pazienti T1DM: i risultati ottenuti mostrano che soggetti portatori degli aplotipi B (282C-750T-1083A-1239C) e C (282C-750T-1083G-1239C) presentano un rischio di circa 1,5 volte superiore di

sviluppare T1DM, (OR 1.41, CI:1.16-1.71  $p=0.0004532$ ) rispetto alla presenza dell'aplotipo A (282C-750T-1083A-1239A), che risulta essere protettivo.

Abbiamo valutato se le variazioni di perforina e di osteopontina potessero avere un effetto cooperativo nello sviluppo del T1DM. I dati ottenuti non individuano alcuna cooperazione tra le variazioni (dati non mostrati).

Nel complesso questo lavoro dimostra per la prima volta il coinvolgimento della variazione N252S del gene di perforina nello sviluppo del T1DM.

Anche se dati in letteratura riportano che tale mutazione correla con una normale attività delle cellule NK e non riduce l'espressione della proteina, è possibile ipotizzare un suo ruolo come fattore di suscettibilità alla malattia se associata ad altri fattori.

## BIBLIOGRAFIA

- Adler B, Ashkar S, Cantor H, Weber GF. Costimulation by extracellular matrix proteins determines the response to TCR ligation. *Cell Immunol.*210(1):30-40, 2001.
- Agnihotri R, Crawford HC, Haro H, Martrisan LM, Havrda MC, Liaw L. Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). *J Biol Chem.* 276(30): 28261-28267, 2001.
- Akahoshi M, Nakashima H, Tanaka Y, Kohsaka T, Nagano S, Ohgami E, Arinobu Y, Yamaoka K, Niiro H, Shinozaki M, Hirakata H, Horiuchi T, Otsuka T, Niho Y. Th1/Th2 balance of periferal T helper cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 42(8):1644-1648, 1999.
- 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.
- Akerblom HK. Et al., Enviromental factors in the etiology of type I diabetes. *Am.J.Med.Genet.* 115:18-29, 2002.
- Andre I. et al., Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:2260-2263, 1996.
- 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.
- Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science.* 287:860-864, 2000.
- Bach JF et al, insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr. Rev.* 15:516, 1994.
- Badovinac V.P., Messingham K.A., Hamilton S.E., Harty J.T.: Regulation of CD8+ T cells undergoing primary and secondary responses to infection in the same host. *J. Immunol.* 170(10), 4933-4942, 2003.
- Badovinac V.P., Porter B.B., Harty J.T.: Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat. Immunol.* 3, 619-626, 2002.
- Baekkeskov S et al, Identification of the 64 Kautoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesising enzyme glutamic acid decarboxilasa. *Nature.* 347:151, 1990.

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 ST, Ludbook SB, Murrison E, Horgan CM. A regulated interaction between alpha5beta1 integrin and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun.* 267(3):764-769, 2000.

Bayless KJ, Davis GE. Identification of dual alpha 4beta1 integrin binding sites within a 38 amino acid domain in the N-terminal thrombin fragment of human osteopontin. *J Biol Chem*, 276(16):13483-13489, 2001.

Bonifacio E. et al., Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA-2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/49 K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J.Immunol.* 155:5419, 1995.

Bosi E et al, Mechanism of autoimmunity: relevance to the pathogenesis of type I (insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.* 3:893, 1987.

Bozzato GF et al., Clinical aspects of Immunology. *Scient Pub.*, 1993.

Bozzato GF et al. How immunology helps to define heterogeneity in diabetes mellitus. The genetics of diabetes mellitus. *London Academy Press.*, 1982.

Carlson I, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Brown LF. Osteopontin is strongly expressed by histiocytes in granulomas of diverse etiology. *Lab Invest.* 77:103-108, 1997.

Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, et al. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science.*294:1731-1735, 2001.

Christie MR et al, Distinct antibody specificities to a 64-KD islet cell antigen in type I diabetes as revealed by trypsin treatment. *J.Exp. Med.* 172:789, 1990.

Clementi R. et al, Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function. *Blood.* 2006, in the press.

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.

Comi C. et al., Defective T cell fas function in patients with multiple sclerosis. *Neurology.* 55:906-7, 2000

Davies JL. Et al., A genome-wide search for human type I diabetes susceptibility genes. *Nature.* 371:130, 1994.

De Franco S. et al., Defective function of fas in patients with type I diabetes associated with other autoimmune diseases. *Diabetes.* 50:483-488, 2001.

Denhardt DT, Burger EH, Kazanecki C, Krisma S, Semensis CM, Klein-Nulend J. Osteopontin-deficient bone cells are defective in their ability to produce no in response to pulsatile fluid flow *Biochem Biophys. Res Commun.* 288(2):448-453, 2001.

Denhart DT, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl.* 30-31:92-102, 1998.

Duong LT, Rodan GA. Integrin-mediated signaling in the regulation of osteoclast adhesion and activation. *Front Biosci.* 3:1757-1768, 1998.

Eiji kawasaki et al., Prevention of type 1 diabetes:from the view point of beta cell damage. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 66:S27-S32, 2004.

Erlich HA. Et al., HLA-DQ beta sequence polymorphism and genetic susceptibility to IDDM. *Diabetes.* 39:96, 1990.

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.

Goldsby R.A., Kindt T.J. and Osborne B.A. *Kuby Immunologia.* 2nda Edizione 2000.

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.

Hashimoto L. et al., Genetic mapping of a suceptibiliyi locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q. *Nature.* 371:161, 1994.

Hawkes CJ. Et al. Identification of the 37 Kda antigen in IDDM as a turosine phosphatase-like protein (phogrin) related to IA-2. *Diabetes.* 45:1187, 1996.

Helen E. Thomas et al., Beta cell destruction in the development of autoimmune daibetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes Metabo.Res.Rev.* 16.251-261, 2000.

Helgason T. et al., Evidence for a food additive as a cause of ketosis-prone diabetes. *Lancet.*318:716-20, 1981.

Henter, J.I., Ekinder, G., Soder, O., Hansson, M., Andersson, B. & Andersson, U. Hypercytokinemia in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood.* 78, 2918–2922, 1991a.

Horn GT. Et al., allelic sequence variation of the HLA-DQ loci: relationship to serology and to insulin-dependent diabetes susceptibility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:6012, 1988.

Iizuka J, Katagiri Y, Tada N, Muakami M, Ikeda T, Sato M, Hirokawa K, Okada S, Hatano M, Tokuhisa T, Uede T. Introduction of an osteopontin gene confers the increase in B1 cell population and the production of anti-DNA autoantibodies. *Lab Invest.* 78(12):1523-1533, 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.

Jacob CO. et al., Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF- $\alpha$  and interleukin-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 87:968-972, 1990

Jansen A. et al., Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cells destruction in NOD mice. *Diabetes.* 43:667-675, 1994.

Kadano H. and Cohen JI. Perforin and lymphohistiocytic proliferative disorders. *British Journal of Haematology.* 128: 739-750, 2004.

Katagiri Y, Mori K, Hara T, Tanaka K, Murakami M, Uede T. Functional analysis of the osteopontin molecule. *Ann N Y Acad Sci.* 760:371-374, 1995.

Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H, et al. CD44 variants but not CD44s cooperate with  $\beta$ 1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res.* 59:219-226, 1999.

Khilil I. et al., A combination of HLA-DQ  $\beta$  Asp57-negative and HLA-DQ  $\alpha$  Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *J.Clin. Invest.* 85:1315, 1990.

Krammer P. H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 407, 12, 2000.

Lammi N. et al., Do microbes have a casual role in type 1 diabetes? *Med.Scin. Monit.* 11: RA63-69, 2005.

Larroche C., Mouthon L.; Pathogenesis of hemophagocytic syndrome (HPS). *Autoimm. Rev.* 3, 69-75, 2004.

Liaw L, Linder V, Schwartz SM, Chambers AF, Giacelli CM. Osteopontin and  $\beta$ 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro. *Circ Res.* 77(4):665-672, 1995.

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.

Lichtenheld, M.G., Podack E.R.: Structure of the human perforin gene. A simple gene organization with interesting potential regulatory sequences. *J. Immunol.* 143(12), 4267-4274, 1988.

Lieberman J.: Mechanism of granule-mediated cytotoxicity. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 513-515, 2003.

Lu J. et al, Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase IA-2beta as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37 Kda tryptic fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:2307,1996.

Masutani K, Akahoshi M, Tsuruya K, Tokumoto M, Ninomiya T, Kohsaka T, Fukuda K, Kanai H, Nakashima H, Otsuka T, Hirakata H. Predominance of Th1 immune response in diffuse proliferative lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 44(9):2097-2106, 2001.

Mauricio D. et al., Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death. *Diabetes.* 47:1537-1543, 1998.

Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J. Osteopontin--a molecule for all seasons. *QJM.* 95:3-13, 2002.

McCauley LK. Transgenic mouse models of metabolic bone disease. *Curr Opin Rheumatol.* 13(4):316-25,2001.

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.

Mossman T.R. et al., TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann.Rev.Immunol.* 7:145-173, 1989.

Motyka B., Korbitt 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.

Nagai S, Hashimoto S, Yamashita T, Toyoda N, Satoh T, Suzuki T, Matsushima K. Comprehensive gene expression profile of human activated T(h)1-and T(h)2-polarized cells. *Int Immunol.* 13(3):367-376, 2001.

Nitta Y. et al., systemic delivery of interleukin 10 by intramuscular injection of expression plasmid DNA prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Hum.Gene.Ther.* 9:1701-1707, 1998.

Norris JM. Et al., Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA.* 290:1713-20, 2003.

O'Brien ER, Garvin MR, Stewart DK et al. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb.* 14:1648-1656, 1994.

O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol*. 81(6):373-390, 2000.

O'Regan AW, Hayden JM, Berman JS. Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol*. 68(4):495-502, 2000.

O'Regan AW, Nau GJ, Chupp GL, Berman JS. Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. *Immunol Today*. 21(10):475-478, 2000.

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.

Ohshima S, Yamaguchi N, Nishioka K, et al. Enhanced local production of osteopontin in rheumatoid joints. *J Rheumatol*. 29:2061-2067, 2002.

Osugi, Y., Hara, J. & Tagawa, S.: Cytokine production regulating Th1 and Th2 cytokines in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 89, 4100–4103, 1997.

Patarca R et al. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: role of early T-lymphocyte activation-1/ osteopontin gene. *Crit. Rev. Immunol*. 13: 225-246, 1993.

Payton MA. Et al., Relationship of the 37000-and40000-M(r) tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein Tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA512). *J.Clin. Invest*. 96:1506,1995.

Philip S, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells. *J Biol Chem* 276(48):44926-44935, 2001.

Piccirillo CA. et al., Prud'homme, TGF-beta1 somatic gene therapy prevents autoimmune disease in nonobese diabetic mice. *J.Immunol*. 161:3950-3956, 1998.

Reinholt FP, Hulthenby K, Oldberg A, Heiegard D. Osteopontin: a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Nat Acad Sci. USA* 87:4473-4475, 1990.

Ritchie A, Broxmeyer HE. Suppression of p53-mediated growth factor withdrawal-induced apoptosis in the myeloid compartment by hematopoietic cytokines: an overview of hematopoiesis and apoptosis with a presentation of thrombopoietin and the M07E cell line as a model system. *Crit Rev Oncol Hematol*. 31(3):169-191, 1999.

Robles DT. et al., Type 1A diabetes induced by infection and immunization. *J.Autoimmun*. 16:355-62, 2001.

Rouslati E, Piersbacher MD. New perspectives in cell adesion: RGD and integrins. *Science*. 238(4826):491-7, 1987.

Sepe V et al, Islet-related Autoantigenes and the pathogenesis of Insulin-Dependent Diabetes mellitus. *Basel*,1997.

Shevach E.M.. Regulatory T Cells in Autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 423-449, 2000.

Shi Fu-Dong, Gustaf H.L. and N. Sarvetnik. Innate immunity and autoimmunity: from self-protection to self-destruction. *Trends in Immunology.* 22, 2001.

Smith LL, Cheung HK, Ling LE, Chen J, Sheppard D, Pytela R, Giachelli CM. Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognised by alpha9beta1 integrin. *J Biol Chem.* 271(45): 28485-28491, 1996.

Smith LL, Greenfield BW, Aruffo A, Giachelli CM. CD44 is not an adhesive receptor for osteopontin. *J Cell Biochem.* 73(1):20-30, 1999.

Smyth M., Cretney E., Kelly J., Westwood J.A., Street S.E.A., Yagita H., Takeda K., Van Dommelen S.L.H., Degli Esposti M., Hayakawa Y.: Activation of NK cytotoxicity. *Mol. Immunol.* 42, 501-510, 2005.

Sobel DO. Et al., Alpha-interferon inhibits the development of diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 47:1867-1872, 1998.

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.

Takada H., Nomura A., Ohga S., Hara T.: Interleukin-18 in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Leuk. Lymphoma.* 42, 21-28, 2001.

Takada, H., Takahata, Y., Nomura, A., Ohga, S., Mizuno, Y. & Hara, T.: Increased serum levels of interferon-gamma-inducible protein 10 and monokine induced by gamma interferon in patients with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Clin. Exp. Immunol.* 133, 448-453, 2003.

Teruya-Feldstein J., Setsuda J., Yao X., et al. :MIP-1alpha expression in tissues from patients with hemophagocytic syndrome". *Lab. Invest.* 79, 1583-1590, 1999.

Thorsdottir I. et al., Dietary intake of 10-to16-years-old children and adolescents in central and northern Europe and association with the incidence of type I diabetes. *Ann.Nutr.Metab.* 47: 267-75, 2003.

Todd JA. et al., HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus. *Nature.* 329:599, 1987.

Todd JA. Genetic analysis of type I diabetes using whole genome approaches, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:8560,1995.

Tominaga Y. et al., Administration of IL-4 prevents autoimmune diabetes but enhances pancreatic insulinitis in NOD mice. *Clin.immunol.Immunopathol.* 86:209-218, 1998.

Trambas C.M., Gallo F., Pende D., Mercenaro S., Moretta L., De Fusco C., Notarangelo L., Arico M., Griffiths G.M.: A single amino acid change, A91V, leads to conformational changes which can impair processing to the active form of perforin. *Blood.* 2005.

Trapani J.A, Sutton V.R., Thia K.Y., Li Y.Q., Froelich C.J., Jans D.A., Sandrin M.S., Browne K.A.: A clatrin/dynamin and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death. *J. Cell. Biol.* 160, 223-233, 2003.

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.

Vaarala O. et al., Cow's milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infants with genetic risk for type I diabetes. *Diabetes.* 48:1389-94, 1999.

Virtanen SM. Et al., Cow's milk consumption, HLA-DQB1 genotype, and type I diabetes: a nested case-control study of siblings of children with diabetes. Childhood diabetes in Finland study group. *Diabetes.* 49:912-17, 2000.

Voskoboinik, I., Thia, M-C., Trapani, J.A.: A functional analysis of the putative polymorphisms A91V and N252S, and 22 missense perforin mutations associated with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood.* 2005.

Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1) *Science* 271:509-512, 1996.

Williams S, Barnes J, Wakisaka A, Osaga H, Liang CT. Treatment of osteoporosis with MMP inhibitors. *Ann N Y Acad Sci.* 878:191-200, 1999.

Wong A, Hwang SM, McDevitt P, McNulty D, Stadel JM, Jonhanson K. Studies on alpha v beta 3/ligand interactions using a [3H]SK&F-107260 binding assay. *Mol Pharmacol.* 50(3):529-537, 1996.

Yokasaki Y, Sheppard D. Mapping of the cryptic integrin-binding site in osteopontin suggests a new mechanism by which thrombin can regulate inflammation and tissue repair. *Trends Cardiovasc Med.* 10:155-59, 2000.

Yoshitake H; Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(14):8156-60, 1999.

Young MF, Kerr JM, Thermine JD. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics*. 7: 491-502, 1990.

Zacone P. et al., Interleukin-13 prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 48:1522-1528, 1999.

Zur Stadt U., Beutel K., Weber B., Kabish H., Schneppenheim R., Janka G., Busiello R., Galgani M., De Fusco C., Poggi V., Adriani M., Racioppi L., Pignata C. A91V is a polymorphism in the perforin gene not causative of an FHLH phenotype. *Blood*. 104, 1909-1910, 2004.

## PUBBLICAZIONI:

Chiocchetti A, Miglio G, Mesturini R, Varsaldi F, Mocellin M, Orilieri E,  
Dianzani C, Fantozzi R, Dianzani U, Lombardi G.

**Group I mGlu receptor stimulation inhibits activation-induced cell death of  
human T lymphocytes.**

*Br J Pharmacol. 2006 Jul;148(6):760-8. Epub 2006 Jun 5.*

Clementi R, Chiocchetti A, Cappellano G, Cerutti E, Ferretti M, Orilieri E,  
Dianzani I, Ferrarini M, Bregni M, Danesino C, Bozzi V, Putti MC, Cerutti F,  
Cometa A, Locatelli F, Maccario R, Ramenghi U, Dianzani U.

**Variations of the perforin gene in patients with  
autoimmunity/lymphoproliferation and defective fas function.**

*Blood. 2006 May 23; [Epub ahead of print]*

## ABSTRACT A CONGRESSI

**“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. (XXVIII Congresso  
Nazionale della Società italiana di Patologia, Università degli studi di Pavia, 19-22 settembre 2006).  
(PRESENTAZIONE POSTER)

**“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. (16<sup>th</sup>European Congress of Immunology; PARIS, 6-  
9- September 2006) (POSTER).

**“Variazioni nel gene di perforina nei pazienti con autoimmunità/linfoproliferazione e  
difettiva funzionalità di Fas”** Cerutti E., Cappellano G., Chiocchetti A., Clementi R.,  
Ferretti M., Orilieri E, Dianzani I., Ferrarini M., Bregni M., Danesino C, Bozzi V., Putti  
M.C., Cometa A., Locatelli F., Maccario R., Ramenghi U., Dianzani U. (XXVIII Congresso  
Nazionale della Società italiana di Patologia, Università degli studi di Pavia, 19-22  
settembre 2006).

## PARTECIPAZIONE A CONGRESSI

**XXVIII Congresso Nazionale della Società italiana di Patologia, Università degli studi di  
Pavia, 19-22 settembre 2006**

## ATTIVITA' FORMATIVA SVOLTA:

Corso di Inglese tenuto dal Prof. Irving Bell

### SEMINARI INTERNI AL DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

**18 Novembre 2005.** Cardiac potassium channel regulation by accessory subunits. Dott. Diego Cotella.

**23 Novembre 2005.** HCV-related steatosis: pathogenic mechanism and clinical implications. Prof. Luigi Elio Adinolfi.

**25 novembre 2005.** Mechanism of transcriptional regulation and disease. Prof. Robert Tjian.

**19 Gennaio 2006.** Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation. Prof.ssa Maria Grano.

**13 Febbraio 2006.** New perspectives in metabotropic glutamate receptors. Prof. Ferdinando Nicoletti.

**15 Febbraio 2006.** Anticorpi ricombinanti: un potente tool biotecnologico. Prof. Daniele Sblattero.

**13 Marzo 2006.** Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell'emofilia. Dott.ssa Atonia Follenzi.

**20 Marzo 2006.** The natural course of preclinical type 1 diabetes. Prof. Mikael Knip.

**6 Aprile 2006.** Aspetti immunogenetici e terapeutici della "hairy cell leukemia". Dott. Francesco Forconi.

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

**4 maggio 2006.** Il mesotelioma: un modello di terapia traslazionale. Dott. Luciano Mutti.

**18 Maggio 2006.** L'epatite autoimmune. Prof. Marco Lenzi.

**30 Maggio 2006.** Sperm mediated gene transfer: storia e applicazioni. Prof.ssa Marialuisa Lavitrano.

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

**27 Giugno 2006.** Osteointegrazione e superfici implantari. Prof.ssa Lia Rimondini.

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