

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



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

Relazione 1° anno

**Analisi del gene H4/ICOS in pazienti con
Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa
e Immunodeficienza Comune Variabile.**

Candidato: Sara Bocca

***Tutor:* Prof. Umberto Dianzani**

INTRODUZIONE

1. APOPTOSI FAS-MEDIATA

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

L'apoptosi può essere indotta attraverso due vie principali: la via estrinseca innescata da specifici recettori di morte espressi sulla membrana cellulare e la via intrinseca, che agisce a livello del mitocondrio. I recettori di morte (*Death Receptors-DR*) trasmettono segnali apoptotici grazie al legame con uno specifico ligando (1). Il DR meglio caratterizzato è Fas.

Fas è una glicoproteina transmembrana di 48 kD , espressa dalla maggior parte dei tessuti ed in modo particolare nei linfociti attivati, e ha un ruolo importante nell'eliminazione dei linfociti T autoreattivi e nel mantenimento dell'omeostasi dei linfociti periferici (2,3).

L'interazione di Fas, assemblato in forma trimerica, con un trimero di FasL innesca una cascata di eventi molecolari che portano alla morte apoptotica della cellula (4). In particolare, Fas lega la molecola adattatrice FADD che, interagendo con pro-caspasi 8, porta alla formazione del cosiddetto *Death-Inducing Signaling Complex* (DISC) (5,6,7,8,9,10).

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

Il *citocromo c* è la molecola chiave della via intrinseca; esso viene rilasciato dal mitocondrio nel citoplasma in seguito alla depolarizzazione della membrana mitocondriale. Il *citocromo c* si lega successivamente alla molecola adattatrice Apaf-1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor-1*) (11,12,13) che lega a sua volta la pro-caspasi 9, portando alla formazione di un complesso detto *apoptosoma* che provoca l'attivazione della caspasi 9 (14,15,16,17).

L'attivazione della caspasi 8 può indurre la via intrinseca attraverso la formazione del frammento proteolitico tBid, derivato da *BH3-interacting domain death agonist* (Bid), una molecola pro-apoptotica citosolica appartenente alla famiglia Bcl-2 (18).

Fas attiva una sфингомielinasi acida ed induce quindi la produzione di ceramide. Sia Bid sia ceramide determinano la depolarizzazione della membrana mitocondriale e quindi il rilascio di *citocromo c*, amplificando così l'apoptosi Fas-mediata (19).

Le caspasi sono proteasi cisteina-dipendenti che proteolizzano il loro substrato tagliando dopo uno specifico residuo di acido aspartico. Queste proteine risiedono nel citoplasma in forma inattiva e, dopo reclutamento mediato dal recettore, si attivano in seguito ad un taglio proteolitico. La cascata delle caspasi attiva numerosi effettori che alla fine conducono alla morte cellulare (20,21,22). Tutte le caspasi sono prodotte sotto forma di proenzimi inattivi, che vengono attivati mediante l'eliminazione proteolitica della subunità inibitoria: l'attivazione può essere autocatalitica o mediata da un'altra caspasi.

La morte cellulare programmata riveste una importanza chiave nella citotossicità cellulo-mediata. I linfociti citotossici (CTL) e le cellule NK, infatti, riconoscono il bersaglio e lo uccidono innescando l'apoptosi attraverso vari meccanismi (23).

La cellula citotossica degranula e libera *perforina* e *granzimi* nello spazio intercellulare che la separa dal bersaglio (24).

I CTL esprimono FasL che, legandosi a Fas espresso dalla cellula bersaglio, attiva la cascata delle caspasi che innesca l'apoptosi (25)

L'apoptosi ha lo scopo di impedire che la risposta immunitaria, dopo l'eliminazione dell'antigene, si indirizzi erroneamente contro molecole *self* simili alle molecole esogene bersaglio della risposta (Fig.1). Questo errore della risposta immunitaria è considerato uno dei meccanismi alla base dello sviluppo di malattie autoimmuni ed è detto "mimetismo molecolare" (26,27).

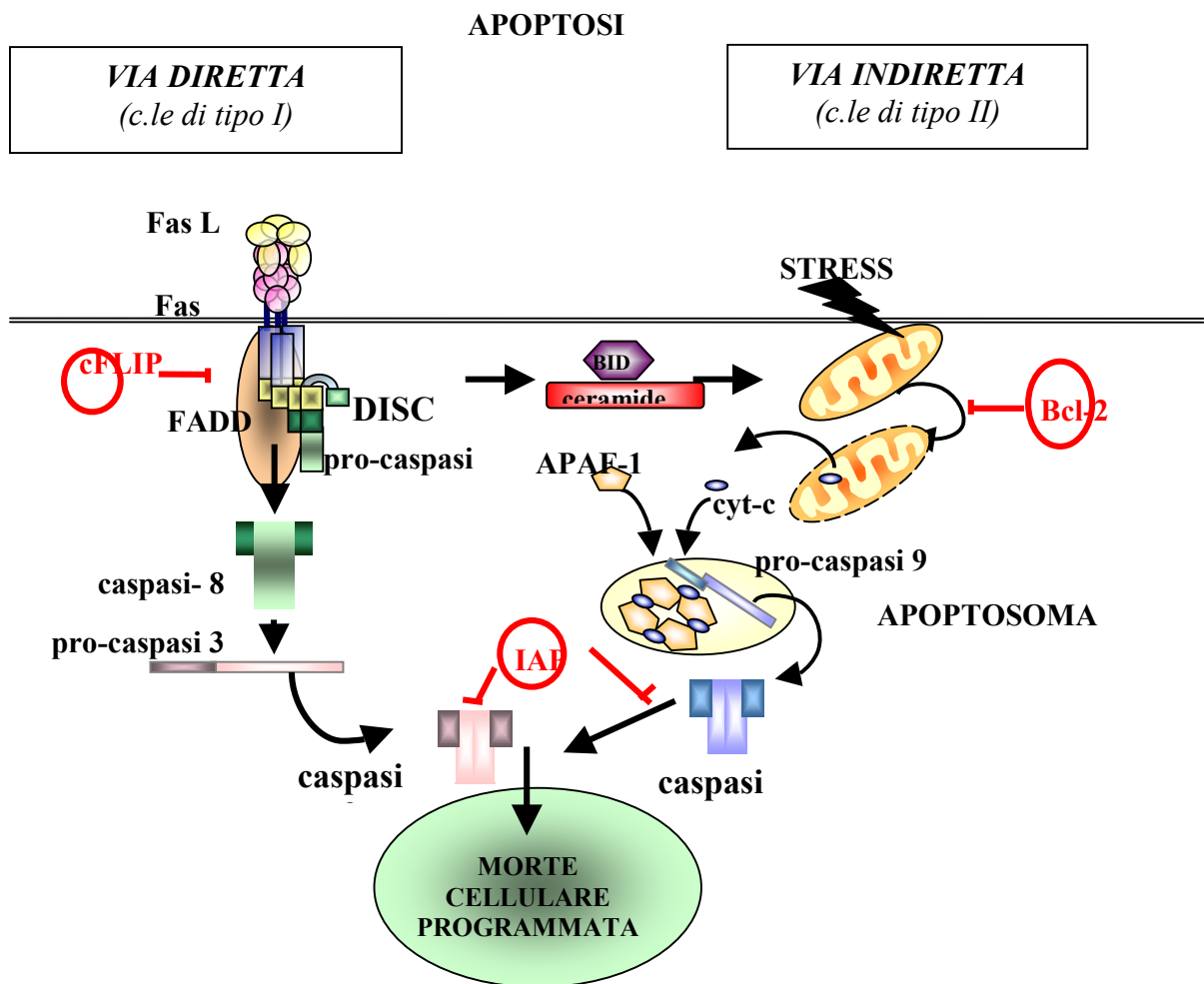


Figura 1. Due possibili vie per il processo apoptotico

Cascata di segnalazione delle due possibili vie che portano al processo apoptotico innescata dall'attivazione di Fas. Le linee nere indicano eventi di attivazione, le linee rosse indicano segnali inibitori.

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 potrà permettere l’attivazione di linfociti T autoreattivi che non si sarebbero mai attivati in un contesto immunologicamente a riposo.

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

Le malattie autoimmuni possono essere divise in due grandi categorie: quelle organo-specifiche e quelle sistemiche (28).

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, 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 γ e Linfotossina, e da linfociti T citotossici (Tc). Esempi di questo tipo di malattie autoimmuni sono il diabete mellito di tipo 1 oppure la sclerosi multipla in cui i linfociti Th1 e Tc aggrediscono rispettivamente le cellule β del pancreas e la mielina del sistema nervoso centrale. In queste malattie si osserva spesso anche la produzione di autoanticorpi, che sono considerati utili marcatori dello sviluppo della malattia, ma questi sarebbero conseguenza del fenomeno dell'*epitope spreading* e avrebbero un modesto ruolo patogenetico.

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 (93,75,74,94). Topi KO per CTLA-4 sviluppano una forma di autoimmunità letale precoce (95). L'inibizione mediante anticorpi di CTLA-4 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 (94,97), mentre il trattamento con anticorpi agonisti di CTLA-4 previene la comparsa della malattia e ne migliora il quadro clinico (98,99). 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.

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 (93,75,74). Recentemente uno studio finlandese ha pubblicato l'associazione tra alcuni polimorfismi di ICOS e il morbo celiaco (100). Finora nessuno studio di associazione genetica è stato pubblicato su ICOS e la sclerosi multipla.

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 un diversa frequenza nel sesso femminile e in quello maschile. Molte di esse, come il lupus eritematoso sistemico, la miastenia grave, la sclerosi multipla 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 altri 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 dai linfociti sia T sia 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 lupus eritematoso sistemico, mentre attenua malattie autoimmuni mediate da cellule infiammatorie (e quindi Th1), come la sclerosi multipla 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'innescamento 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 diabete mellito insulino-dipendente è circa 20 volte maggiore in soggetti che esprimono HLA-DR3 e DR4, rispetto a soggetti che esprimono altri alleli; la probabilità di sviluppare sclerosi multipla è 5 volte maggiore nei portatori di DR2; quella di sviluppare miastenia grave è 5 volte maggiore nei portatori di DR3. L'associazione più stretta è però stata osservata nella *spondilite anchilosante*, il cui rischio di sviluppo è 90 volte superiore in soggetti portatori della molecola di classe I HLA-B27.

In molti casi è stato dimostrato che questa associazione può essere dovuta all'efficienza con cui le molecole predisponenti "presentano" i peptidi self responsabili di quella malattia autoimmune. E' intuitivo infatti che gli individui che esprimono molecole HLA capaci di presentare efficientemente i peptidi self verso cui si sviluppa una certa risposta autoimmune siano più predisposti allo sviluppo

della malattia rispetto a soggetti che esprimono molecole MHC poco efficienti nella presentazione degli stessi.

2.3 Autoimmunità e difetti genetici ereditari della funzione di Fas: la sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS)

La sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS) è una malattia autoimmune sistemica. E' dovuta ad un difetto genetico a carico dell'apoptosi, cui consegue alterazione dell'omeostasi dei linfociti e della tolleranza immunologica; si trasmette in maniera autosomica dominante a penetranza variabile.

La malattia è stata descritta per la prima volta nel 1967 e denominata sindrome di Canale-Smith. I pazienti sviluppano entro i primi anni di vita una sintomatologia autoimmune prevalentemente ematologica, caratterizzata da anemia emolitica, piastrinopenia, epatosplenomegalia e linfadenopatia non neoplastica. Talora si presentano anche vasculiti. I pazienti mostrano, inoltre, un aumento del numero dei linfociti T doppi negativi per CD4 e CD8. Alcuni dei precursori immaturi possono esprimere transitoriamente CD4 dopo essere entrati nel timo, ma la maggior parte delle cellule non esprime né CD4 né CD8. Le cellule doppio negative sono localizzate soprattutto a livello sub-capsulare del timo ed in queste condizioni sono altamente proliferanti. Dalla regione sub-capsulare migrano nella corticale dove maturano. In questa sede i timociti iniziano ad esprimere il TCR e maturano in linfociti CD4 positivi o in linfociti CD8 positivi. Si ritiene che i linfociti doppi negativi presenti nell'ALPS siano linfociti che abbiano perduto l'espressione di membrana del CD4 e del CD8 e ce non siano quindi da identificare con i linfociti immaturi.

Negli individui con ALPS il sistema immunitario è efficiente: tuttavia i linfociti, espansi nel corso della risposta immunitaria, non vanno incontro efficientemente ad apoptosi. Ciò causa un aumento del numero dei linfociti T soprattutto a livello della milza, dei linfonodi e talvolta anche a livello del fegato. Le

manifestazioni autoimmuni dipendono dalla mancata delezione di cloni di linfociti autoreattivi a causa del difetto del meccanismo apoptotico.

Sono stati individuati modelli murini caratterizzati da mutazioni recessive a carico del gene *apt-1* che codifica per Fas e del gene che codifica per FasL, rispettivamente nei topi *lpr* (lymphoproliferation) e *gld* (generalized lymphoproliferative disease) (29). Topi omozigoti per la mutazione (*lpr/lpr* o *gld/gld*) sviluppano un quadro caratterizzato da:

- 1) linfadenopatia, splenomegalia,
- 2) autoimmunità con ipergammaglobulinemia, produzione di autoanticorpi, glomerulonefrite, artrite, vasculite
- 3) espansione policlonale in periferia di linfociti T TCR $\alpha\beta^+$ privi di CD4 e CD8 (propri dei T helper e dei T citotossici, rispettivamente) e per questo detti “doppi negativi” (DN). Essi sono bloccati allo stadio G₀-G₁ del ciclo cellulare e probabilmente derivano da linfociti T maturi CD4⁺CD8⁻ o CD4⁻CD8⁺.

Nei topi *lpr* sono state identificate due tipi di alterazioni genetiche, una impedisce l'espressione in superficie di Fas (mutazione *lpr*), mentre l'altra porta all'espressione di una molecola di Fas incapace di trasmettere il segnale apoptotico alla cellula (mutazione *lpr^{cs}*). I topi *gld* sono invece caratterizzati da una mutazione a livello della porzione extracitoplasmatica di FasL con conseguente alterazione del sito di legame con Fas.

Il nesso causale tra l'alterata funzione del sistema Fas/FasL e la malattia è stato confermato dall'osservazione che topi knock-out per Fas sviluppano un quadro simile a quello dei topi *lpr* e *gld*; è possibile correggere il difetto nei topi *lpr* mediante l'espressione della forma *wild type* di Fas (30).

Le manifestazioni autoimmuni e l'iperproliferazione linfocitaria di questi animali sono probabilmente legate al difettoso spegnimento della risposta immunitaria da parte di Fas, che porta da un lato all'accumulo dei linfociti nel corso di attivazioni successive del sistema e dall'altro all'espansione di cloni autoimmuni (**Figura 2**).

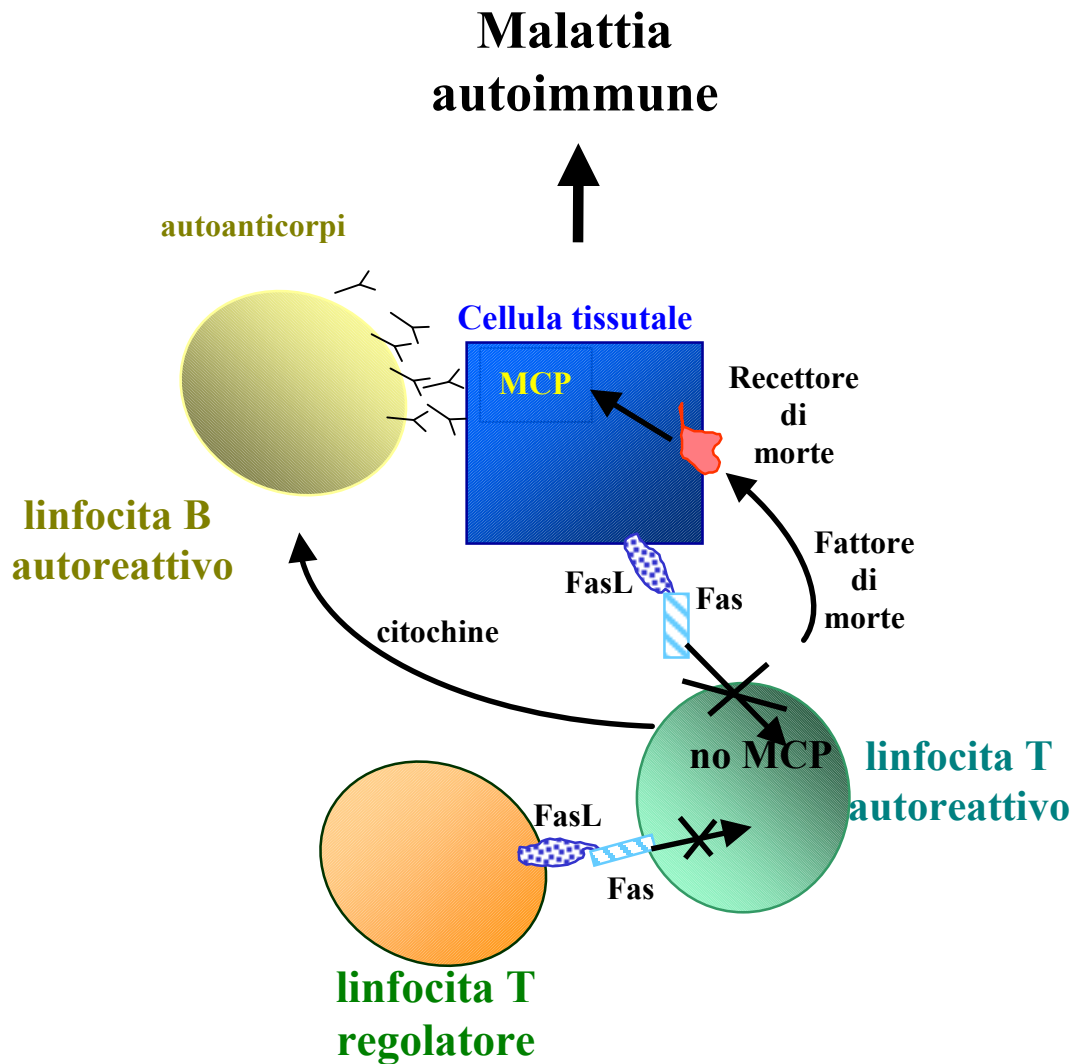


Figura 2. Autoimmunità e accumulo di linfociti T

Il difettoso spegnimento della risposta immunitaria da parte di Fas può portare all'accumulo di linfociti nel corso di attivazioni successive e all'espansione di cloni autoimmuni.

Come nel modello murino, anche nei pazienti con ALPS la funzionalità di Fas è ridotta a causa di mutazioni ereditarie deleterie che colpiscono geni coinvolti in questo sistema. Nei pazienti con ALPS di tipo Ia (ALPS-Ia) il difetto genetico è a carico del gene di Fas (37); nei pazienti con ALPS-Ib è mutato il gene di FasL (38); nei pazienti con ALPS-II è mutato il gene di caspasi 10, che sembra in qualche modo coinvolta nella trasduzione del segnale di Fas; in altri pazienti Fas non funziona, ma

il difetto genetico non è ancora stato identificato: si parla in questi casi di ALPS-III (39).

Sia nel topo che nell'uomo il quadro ALPS non sembra essere rigorosamente monogenico. Nel topo le mutazioni *lpr* e *gld* causano la malattia in omozigosi, ma la loro espressione dipende fortemente dal contesto genetico, tant'è che è molto ridotta nei topi BALB/c rispetto ai topi MLR (40). Altri fattori complementari sembrano quindi essere richiesti per lo sviluppo della malattia.

Anche nell'uomo la situazione sembra essere simile. Infatti nell'ALPS Ia la maggior parte dei pazienti è eterozigote per la mutazione di Fas, ma questo non sembra sufficiente per lo sviluppo della malattia in quanto il genitore portatore della mutazione è sempre sano.

La possibilità che questo "secondo fattore" necessario per lo sviluppo di ALPS abbia basi genetiche è suggerita dal fatto che spesso il secondo genitore (privo di mutazioni di Fas) presenta in genere anch'esso una ridotta funzionalità di Fas.

L'espressione della malattia quindi, potrebbe dipendere dal tipo e dalla gravità delle mutazioni e/o dalla co-presenza di più mutazioni o polimorfismi a carico della via di trasduzione del segnale .

2.3.1 La malattia autoimmunelinfoproliferativa di Dianzani (DALD), una variante di ALPS

Nel nostro laboratorio è stato identificato un gruppo di pazienti con un quadro clinico simile a quello degli ALPS con:

- 1) ridotta funzionalità di Fas
- 2) autoimmunità prevalentemente ematologiche
- 3) accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari, con linfadenopatie e/o splenomegalia,

ma privi della classica espansione di linfociti T DN nel sangue periferico, necessaria per la diagnosi di ALPS (41,42,43).

I linfociti T dei soggetti studiati sono resistenti alla morte cellulare indotta da Fas, ma non presentano mutazioni in Fas, FasL o caspasi-10. In aggiunta, i linfociti T della maggioranza di questi pazienti sono anche resistenti alla morte cellulare indotta da etoposide, che agisce direttamente sul mitocondrio. La componente ereditaria della malattia è suggerita dal fatto che anche i genitori dei pazienti presentano una ridotta funzionalità di Fas (pur in assenza di malattia, come nell'ALPS). Inoltre, la fusione somatica dei linfociti T Fas-resistenti dei pazienti con una linea linfocitaria tumorale Fas-sensibile determina la produzione di cellule ibride Fas-resistenti. Questi dati suggeriscono il coinvolgimento di mutazioni che colpiscono la via di Fas a valle del recettore e determinano la produzione di molecole che esercitano un'attività dominante negativa sulla funzione di Fas.

Questa forma di ALPS "incompleto" è stata denominata DALD (*Dianzani's ALD*) da McKusick sul sito OMIM del NIH (riferimento OMIM #605233; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>).

2.4 Coinvolgimento dei difetti funzionali di Fas nello sviluppo di malattie autoimmuni comuni.

L'analisi delle famiglie dei pazienti con DALD ha evidenziato una aumentata incidenza di malattie autoimmuni comuni, quali lupus eritematoso sistemico, sclerosi multipla, diabete mellito di tipo 1 o artrite reumatoide in assenza di segni di "linfoproliferazione". Questa osservazione suggerisce che le alterazioni genetiche alla base della DALD possano anche favorire lo sviluppo di malattie autoimmuni comuni. Tale possibilità è stata poi confermata dall'osservazione che una ridotta funzionalità di Fas su base ereditaria è presente anche in circa il 50% dei pazienti con sindrome autoimmune multipla (MAS) (ovvero appartenenti a famiglie con più di un caso di malattia autoimmune entro il secondo grado di parentela) e in sottogruppi di pazienti sporadici con diabete mellito di tipo 1, con sclerosi multipla

o con autoimmunità tiroidee. In particolare il difetto era particolarmente frequente nei pazienti che presentavano quadri aggressivi di queste autoimmunità (44,45,46).

2.5 Altri sistemi coinvolti nello sviluppo di quadri autoimmuni/linfoproliferativi

Alcuni modelli murini evidenziano che quadri autoimmuni/linfoproliferativi possono anche non coinvolgere solo il sistema Fas/FasL, infatti, sono state trovate alterazioni che coinvolgono altri sistemi recettoriali. Alcuni di questi difetti alterano sistemi di spegnimento della risposta immunitaria mediati da molecole diverse da Fas, come ad esempio PD-1 e CTLA-4. Altri difetti possono invece favorire la proliferazione linfocitaria piuttosto che diminuire l'apoptosi, mediante il coinvolgimento di molecole come BAFF e PTEN. Questi modelli murini suggeriscono che manifestazioni simili all'ALPS possono essere causate da alterazioni che coinvolgono non solo l'apoptosi, ma anche la proliferazione dei linfociti.

3. IMMUNODEFICIENZA COMUNE VARIABILE

L'immunodeficienza comune variabile (CVID) è una sindrome eterogenea caratterizzata da ipogammaglobulinemia e ricorrenti infezioni batteriche. E' stata descritta per la prima volta nel 1953, poco tempo dopo la prima descrizione che Bruton fece riguardo di una malattia affine: l'Agammaglobulinemia associata all'X (XLA) (60). Il fenotipo dei pazienti affetti da CVID è molto variabile e questo ha contribuito a rendere difficoltosa la determinazione delle cause che stanno alla base della malattia. Questa rara sindrome ha una frequenza nella popolazione stimata tra 1 persona ogni 50.000 a 1 persona ogni 200.000 e, a differenza dell'Agammaglobulinemia associata all'X, è ugualmente distribuita nei maschi e nelle femmine (61,62). Anche l'età di insorgenza della malattia è molto variabile, anche se nella maggior parte dei casi insorge tra i dieci e i trent'anni (63,64,65).

Da un punto di vista clinico, i pazienti affetti da CVID presentano ricorrenti infezioni batteriche del tratto respiratorio come sinusite, otite, bronchite e polmoniti. I più comuni agenti eziologici scatenanti le infezioni sono batteri come *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. Queste infezioni rappresentano una diretta conseguenza di una produzione deficitaria di anticorpi (bassi livelli del siero di IgG e IgA e in molti casi, bassi livelli di IgM), caratteristica distintiva di questa malattia. Se pazienti affetti da CVID non vengono diagnosticati e di conseguenza curati, le ricorrenti infezioni polmonarie possono condurre ad irreversibili malattie croniche dei polmoni (66). In alcuni pazienti lo spettro di batteri patogeni è più ampio e può comprendere *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Setticemia e ricorrenti infezioni della pelle, delle vie urinarie, delle giunture o del sistema nervoso centrale possono comparire in pazienti affetti da CVID, pur essendo tuttavia, fenomeni meno frequenti (67,68,69).

In rari casi i pazienti possono essere infettati da micobatteri, *Pneumocystis carinii* e vari funghi; la comparsa di queste infezioni può essere causa di importanti anomalie cliniche dell'immunità cellulo-mediata oltre che di quella umorale. Generalmente pazienti affetti

da CVID non presentano una aumentata suscettibilità ad infezioni virali (herpes per esempio), anche se tuttavia esistono delle eccezioni .

Agenti patogeni come *Giardia lamblia*, *Salmonella* e *Shigella*, possono essere causa di infezioni gastrointestinali determinando diarrea, perdita di peso e quadri di malassorbimento. Questi aspetti clinici possono dar luogo a situazioni di cronicità in alcuni pazienti, con fenomeni di mal-assorbimento e perdita di peso che possono perdurare da alcuni mesi fino a diversi anni.

Circa il 20% dei pazienti affetti da CVID possono sviluppare col tempo una o più malattie autoimmuni evidenziando il fatto che la CVID è una malattia caratterizzata da una regolazione anormale dell'immunità oltre che da immunodeficienza (67,68,69).

L'anemia emolitica e la trombocitopenia purpurea idiopatica sono le due più comuni malattie autoimmuni associate alla CVID, ma frequenti sono anche il lupus eritematoso sistemico, l'artrite reumatoide e la sindrome di Sjogren (67,68,69).

Alla CVID viene associata anche una frequente suscettibilità all'insorgenza di disordini linfoproliferativi nonché allo sviluppo di linfomi maligni; è proprio l'alta incidenza di questi ultimi (e di tumori in genere) un'ulteriore prova della presenza di difetti nell'immunità cellulo-mediata (66). Ancor più comune di linfomi maligni è tuttavia la presenza di disordini linfoproliferativi benigni, infatti circa il 30% dei pazienti con CVID manifestano splenomegalia, linfadenopatia diffusa o entrambi (66).

A differenza dell'Agammaglobulinemia associata all'X, nella quale si assiste ad una virtuale assenza di linfociti B maturi (a causa di un blocco nella maturazione delle cellule B allo stadio di pre-linfociti B), la maggior parte dei pazienti affetti da CVID presentano un numero normale di linfociti B maturi nel sangue periferico e nei tessuti linfoidei; tuttavia, le cellule B di questi pazienti non sono in grado di differenziarsi in cellule normali secernenti immunoglobuline (66).

L'elevata eterogenicità degli aspetti clinici ed immunologici della CVID ha per lungo tempo reso difficile gli studi sulla sindrome, in quanto in molte pubblicazioni sono stati inclusi pazienti con aspetti molto diversi, rendendo confusi i risultati ed impedendo la reale comparazione con altre ricerche.

Tutti i meccanismi proposti per spiegare le anomalie immunologiche nei pazienti affetti da CVID riflettono l'elevata variabilità di questa sindrome e suggeriscono l'idea che più di un gene ne è probabilmente implicato .

Vari studi indicano che la CVID è causata nella maggior parte dei casi da difetti di maturazione o attivazione o differenziazione intrinseca dei linfociti B. In alcuni casi tuttavia possono essere coinvolti anche difetti dei linfociti T, come recentemente dimostrato in pazienti con CVID portatori di mutazioni a carico del gene per ICOS, una molecola costimolatoria espressa dai linfociti T. Tale difetto si ripercuoterebbe sulla produzione anticorpale facendo venir meno un'efficace "help" dei linfociti T *helper* ai linfociti B.

4. H4/ICOS

4.1 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 (70,71). 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) (72). Il nostro laboratorio ha dimostrato che H4 e ICOS sono in realtà la stessa molecola (73).

Il gene che codifica per ICOS 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 (72). Il gene ICOS è polimorfico ed è costituito da 5 esoni e 4 introni e 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 (74) (**Figura 3**).

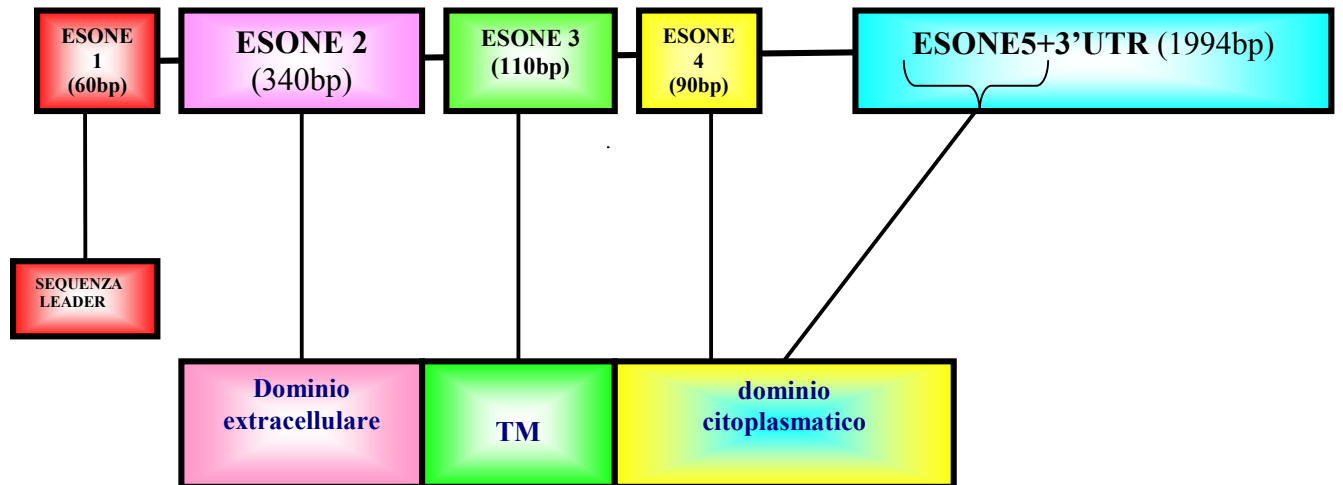


Figura 3. Struttura del gene e dei domini strutturali di ICOS

ICOS è codificato da un gene polimorfico caratterizzato da siti regolatori, microsatelliti, mutazioni e SNPs (single nucleotide polymorphisms) distribuiti nel seguente modo (75,7476,77,78):

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.*

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 (74). 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 (75). 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 tutti quelli del 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).

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 (72).

4.2 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 e 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 e definito complesso del CD3 e costituito dalle catene γ, δ, ϵ . Il TCR non riconosce l'antigene libero in soluzione, ma solo legato a particolari molecole denominate MHC (Major Hystocompatibilty 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) e sono rappresentate da linfociti B, cellule dendritiche e macrofagi. 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
- 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.

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 tirosinasi 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

L'attivazione dei linfociti T richiede due distinti segnali, uno costituito dal legame del complesso antigene-MHC espresso dalle cellule APC con il TCR del linfocita T e 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 uno (legame complesso antigene-MHC con il TCR del linfocita T) in assenza del segnale due (costimolazione) non attiva i linfociti T ma induce uno stato di anergia clonale o morte cellulare del linfocita per apoptosi. (79). La molecola costimolatoria per eccellenza è CD28, espresso costitutivamente dai linfociti T e in grado di legare le molecole B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) espresse sulle cellule APC attivate (80). Il segnale mediato da CD28 sinergizza con quello trasdotto 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 effettive del linfocita. (81). 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) (79).

ICOS rappresenta il terzo membro della famiglia di CD28 e contrariamente a CD28 è espresso solo in seguito all'attivazione. L'espressione di ICOS sulla superficie dei linfociti T è rapidamente indotta nelle prime fasi della differenziazione su entrambe le popolazioni linfocitarie Th (Th1 e Th2), ma l'espressione dopo l'attivazione rimane alta solo nella sottopopolazione Th2 (82). 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 $\text{INF-}\gamma$, IL-12 e $\text{TNF}\alpha$, media una risposta infiammatoria verso cellule infettate da virus o batteri intracellulari ed è importante in varie patologie autoimmuni organo specifiche, mentre la popolazione Th2 produce molecole quali IL-4, 5, 9, 10, 13, media le reazioni immunitarie di tipo umorali verso patogeni extracellulari e verso patogeni intestinali ed è coinvolta nelle reazioni allergiche grazie all'effetto che ha sulla produzione di IgE da parte dei linfociti B (83). 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. ICOSL può essere espresso anche da tessuti non linfoidi in seguito a stimoli di natura infiammatoria (84). 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 (85). A differenza di CD28 la cui attivazione induce la sintesi di IL-2, l'attivazione di ICOS nel topo sembra indurre la sintesi IL-4 e non quella di IL-2. Livelli di IL-2 incapaci di sostenere una risposta immunitaria completa ma in grado solo di indurre le fasi iniziali della proliferazione sembrano essere percepiti in seguito all'attivazione di ICOS in un lavoro di Riley e coll. (86). 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 (87). 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 (86). La costimolazione selettiva di ICOS al posto di CD28 in periferia conferirebbe funzioni effettrici alle cellule T senza tuttavia conferire la capacità di proliferare a lungo termine (dovuta alla mancanza di IL-2) (86). Questa ipotesi è supportata dal fatto che l'espressione di ICOS è aumentata nelle cellule T effettrici (88) e che le funzioni effettrici delle cellule T sono stimulate dalla costimolazione con ICOS (89). La costimolazione con ICOS potrebbe quindi essere un

meccanismo per attivare rapidamente le cellule memoria ed effettrici senza indurre un'espansione clonale che potrebbe favorire lo sviluppo di reazioni autoimmuni (90).

Dati 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 (91). Una possibilità è che per avere un'ottimale attivazione dei linfociti T sia necessaria la costimolazione da parte di entrambe le molecole in vivo. Diversamente potrebbe essere che ICOS e CD28 agiscono 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 da parte delle cellule B (produzione di citochine ed espressione di CD40L) (92).

SCOPO DEL LAVORO

Nel nostro laboratorio abbiamo studiato, recentemente, il coinvolgimento di variazioni del gene ICOS nello sviluppo della Sclerosi Multipla (MS), malattia neurodegenerativa del Sistema Nervoso Centrale caratterizzata da lesioni demielinizzanti di tipo infiammatorio. E' stato dimostrato che polimorfismi nel 3'UTR del gene possono essere coinvolti nella suscettibilità alla malattia. Poiché ICOS è coinvolto in altre patologie autoimmuni quali il diabete mellito, le tiroiditi autoimmuni e il morbo celiaco abbiamo deciso di valutare se le variazioni essere significative nella MS potessero costituire fattori di rischio anche per lo sviluppo di malattie autoimmuni più rare come l'ALPS e la CVID.

MATERIALI E METODI

6. PAZIENTI.

Nel nostro studio abbiamo analizzato 30 pazienti con ALPS e 76 pazienti con CVID ,e 110 controlli sani, etnicamente correlati, provenienti dal Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università del Piemonte Orientale. 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.

6.1 ESTRAZIONE DI DNA DA SANGUE.

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

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

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

6.2 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._{260 nm} per il DNA

40 µg/ml corrispondono a 1 O.D._{260 nm} per l'RNA

Un ulteriore lettura a 280 nm viene utilizzata per valutare la purezza del DNA o dell'RNA; il rapporto ottimale OD₂₆₀/ OD₂₈₀ per il DNA è pari a 1.8, mentre per l'RNA è pari a 2.

6.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

L'esone 5 e il 3'UTR del gene ICOS sono stati amplificati da campioni di DNA genomico estratto da pazienti e da controlli sani. Essendo un frammento di dimensioni pari a 2190 bp, si è pensato di procedere allestendo una duplex e una PCR in singolo, in modo da ottimizzare tempi e costi.

La reazione di PCR è stata allestita con 100-200 ng di DNA utilizzando i primers descritti in **Tabella 1**.

	PRIMERS	MgCl ₂
ICOS1F-5R ICOS3-8R	ICOS1F:5'-gcaatggagaggggaaagc-3' ICOS5R:5'-cagcaattgaaggagagtac-3' ICOS3:5'-tcactgggagtggaatcc-3' ICOS8R:5'-gagtctctcaacctggaat-3'	4 mM
ICOS4-3'UTR	ICOS4:5'-ctgggcttgacaggtcaaaatg-3' ICOS3'UTR:5'-gaaagcaactgttccaagca-3'	2 mM

Tabella 1. Condizioni di PCR dell'esone 5 e del 3'UTR di ICOS (F, forward; R, reverse).

La miscela di reazione è composta dal tampone di reazione (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0,5 μ M di ciascun oligonucleotide, 0,2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi, e 1U Taq DNA polimerasi (5U/ μ l) (Invitrogen). Le reazioni di PCR necessitano per avvenire di MgCl₂: esso era concentrato 4 mM nella reazione di amplificazione della duplex e 2 mM per la singola. Le condizioni di reazione sono le seguenti:

Frammento 1F-5R;3-8R

94°C 5' }
94°C 30" } 35 cicli
58°C 30" }
72°C 55" }
72°C 10'

Frammento 4-3'UTR

94°C 5' }
94°C 30" } 35 cicli
58°C 30" }
72°C 40" }
72°C 10'

6.4 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

6.5 SEQUENZIAMENTO AUTOMATICO

I prodotti di PCR, sono stati purificati dall'eccesso di primers e di nucleotidi non incorporati, utilizzando gli enzimi EXO e SAP (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 μ l, sono stati addizionati al DNA purificato, 2 μ l di BigDye Sequencing Buffer (in dotazione con il kit) , il primer (3,2 μ M/ μ l). La reazione di sequenziamento prevede l'utilizzo del seguente programma:

96°C 1'	}	1 ciclo
96°C 10''		
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 SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup (Montage). 5 μ l del purificato sono stati addizionati a 10 μ l di formammide, denaturati (3' a 95°C), e caricati su piastra ottica per la successiva analisi al sequenziatore.

6.6 ANALISI STATISTICA

L'analisi della distribuzione dei polimorfismi e degli aplotipi nelle popolazioni è stata fatta con il test del χ^2 . I valori di p sono stati calcolati tenendo conto di tutti i parametri necessari. La distribuzione dei genotipi è stata analizzata con il test del Chi quadro o

Fisher . Tutti i valori assunti dalle p avevano due code (cut-off $P < 0,05$). Per l'analisi degli aplotipi è stato utilizzato il software haploview.

RISULTATI

7. RICERCA DI VARIAZIONI NEL GENE DI ICOS IN PAZIENTI CON ALPS E CVID.

Recentemente nel nostro laboratorio è stata evidenziata l'associazione di un aplotipo formato da SNPs del gene di ICOS nella regione 3' UTR, con la suscettibilità alla sclerosi multipla.

Questo aplotipo è stato valutato su uno studio caso-controllo evidenziando che solo 8 dei 47 polimorfismi noti in letteratura in questa regione (<http://snpper.chip.org>) sono presenti nella nostra popolazione (+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. I polimorfismi nelle seguenti posizioni, +602, +1564, +2007 sono infatti risultati in perfetto LD tra loro ($D'=1$, $r^2=0.95-1$) questo vale anche per i seguenti altri SNPs +930, +1459, +1624, +1862 ($D'=1$, $r^2=1$).

L'analisi statistica-informatica ha evidenziato 3 principali aplotipi (A, B e C) che rappresentano circa il 99% delle possibili combinazioni aplotipiche (Tabella 5). 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, è stata valutata nei pazienti e nei controlli. La frequenza dell'allele +1564 T (aplotipo A) è 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.

Partendo da questi dati il passo successivo è stato quello di valutare se questi polimorfismi e aplotipi sono presenti anche nelle popolazioni di pazienti ALPS e CVID. La regione del DNA corrispondente al 3'UTR e all'esone 5 di ICOS è stata amplificata mediante PCR e sottoposta ad analisi tramite sequenziamento diretto in 29 pazienti ALPS, 75 pazienti CVID e 82 controlli sani, valutando tutti gli otto polimorfismi presenti in letteratura (Tabella 2).

*POSIZIONE NUCLEOTIDE	SNP id	LOCALIZZAZIONE	ALLELI
+595	/	ESONE 5	C/G
+602	rs10183087	ESONE 5	A/C
+930	rs10932035	3'UTR	A/G
+1459	rs10932036	3'UTR	A/T
+1564	rs4404254	3'UTR	C/T
+1624	rs10932037	3'UTR	C/T
+1862	rs10932038	3'UTR	A/G
+2007	rs1559931	3'UTR	A/G
+2373	rs4675379	3'UTR	C/G

*numerazione relativa al cDNA,+1 è la prima base del codone di inizio ATG

Tabella 2: Polimorfismi e mutazioni del gene di ICOS descritti in letteratura.

Dal sequenziamento di questa regione è emerso un nuovo polimorfismo in posizione +595 dell'esone 5 mai riportato in letteratura; questa variazione missenso determina il cambiamento della prima base della tripletta variando l'amminoacido da una leucina a una valina .

I risultati dell'analisi nei 29 pazienti ALPS e negli 82 controlli su tutti i nove polimorfismi ha evidenziato che la variazione +2373 C/G ha una frequenza allelica significativamente più alta nei pazienti rispetto ai controlli (33% vs 16% p= 0.010) ed incrementa di circa 3 volte il rischio di sviluppare la malattia (Tabella 3). Questo risultato si discosta da quello valutato nei pazienti SM, in cui questo SNPs non risultava significativo.

VARIAZIONE NUCLEOTIDICA	GENOTIPI	ALPS		CVID		CONTROLLI	
		N°	%	N°	%	N°	%
SNP +2373 C/G	CC	6	(21)	4	(5)	3	(3)
	CG	7	(24)	19	(25)	19	(23)
	GG	16	(55)	52	(69)	60	(73)
SNP+2373 C/G	ALLELE	ALPS		CVID		CONTROLLI	
		N°	%	N°	%	N°	%
	C	19	(33)	27	(18)	23	(16)
	G	39	(67)	123	(82)	125	(84)
		p=0.010		NS			
		OR=2.65 CI: 1.23-5.69					

Tabella 3: Frequenze genotipiche e alleliche della variazione +2373 C/G in pazienti ALPS e CVID.

Se la popolazione dei pazienti viene suddivisa tra ALPS e DALD si può osservare che il polimorfismo +2373 C/G risulta essere significativo solo nella popolazione ALPS (Tabella 4). Entrambe le popolazioni soddisfano l'equilibrio di Hardy-Weinberg.

ALLELE	ALPS	DALD	CONTROLLI
C	9 (41%)	10 (28%)	23 (16%)
G	13 (59%)	26 (72%)	125 (84%)
	p=0.0084 OR=3.76 CI=1.30-10.84		NS

Tabella 4: Frequenza allelica della variazione +2373 C/G in popolazioni ALPS/DALD

L'analisi di tutti gli otto polimorfismi nei 75 pazienti CVID e 82 controlli non ha evidenziato nessuna significatività degli SNPs.

Per confermare l'associazione tra i polimorfismi e valutare la corrispondenza tra i dati ottenuti nella sclerosi multipla, abbiamo utilizzato un software statistico (Haploview) che calcola le possibili combinazioni aplotipiche in base ai dati ottenuti dal sequenziamento dei 29 pazienti ALPS, 75 CVID e 82 controlli sani. I risultati del programma indicano gli stessi aplotipi studiati nella SM con l'eccezione dello SNP +2373 C/G, significativo nei pazienti ALPS, che non risulta essere il linkage con gli altri (+602 A/C, +930 G/A, +1459 A/T, +1564 T/C, +1624 C/T, +1862 A/G, +2007 A/G); questo potrebbe significare che il polimorfismo possa essere in linkage con altre variazioni, o che solo esso sia coinvolto nella suscettibilità alla malattia. I differenti aplotipi non raggiungono la significatività statistica dato il ridotto numero dei soggetti coinvolti nello studio. Successivamente è stata calcolata la frequenza allelica e genotipica degli SNPs +1459 A/T e +1564 C/T, che individuano le combinazioni aplotipiche A e B, nei pazienti e nei controlli. La frequenza dell'allele +1564 T (aplotipo A) è risultata essere maggiore nel gruppo dei controlli rispetto a quello dei pazienti ALPS, mentre lo SNP +1459 A che individua l'aplotipo B, è risultato avere una frequenza maggiore nei pazienti.

haplotype	602 A/C	930 G/A	1459 A/T	1564 T/C	1624 C/T	1862 A/G	2007 G/A	2373 G/C
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

Tabella 5: Combinazioni aplotipiche in pazienti ALPS,CVID e SM.

DISCUSSIONE

ICOS è espresso selettivamente sulle cellule T dopo la loro attivazione, esso intensifica tutte le risposte basali dei linfociti T all'antigene: proliferazione, secrezione di citochine, espressione di molecole che mediano l'interazione cellula-cellula inducono la sintesi di citochine (IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TNF- α), L'interazione di ICOS con il suo ligando gioca un ruolo importante nella cooperazione linfociti B/linfociti T; in particolare ICOS ha un ruolo nel differenziamento e nello sviluppo della memoria dei linfociti B, nello switch isotipico delle immunoglobuline, e nella formazione dei centri germinali (101,102). Queste evidenze sono state confermate dal fenotipo tra pazienti con immunodeficienza comune variabile che presentavano perdita omozigote di ICOS. È possibile proporre un modello per tale interazione. Inizialmente il legame di CD28 con i ligandi B7-1 o B7-2 espressi dai linfociti B, avvia la comunicazione B/T; contemporaneamente è indotta l'espressione di ICOS, la cui interazione col ligando modula la produzione citochinica dei linfociti T, favorendo soprattutto la produzione di IL-4 e IL-10; in una terza fase, viene espresso CTLA-4 che opera un'azione negativa sull'attivazione del linfocita T. Diversi studi (103,104) hanno preso in considerazione i polimorfismi dell'esone 5 e del 3'UTR di ICOS in pazienti CVID senza dare risultati significativi, altre (103) hanno evidenziato che la forma autosomica recessiva della CVID potrebbe essere associata ad una mutazione nella regione codificante di ICOS, non ritrovata nei casi sporadici. Questi pazienti non

esprimono ICOS e per questo manca una adeguata interazione linfociti T/linfociti B. Di conseguenza i pazienti non possono generare un numero sufficiente di cellule B della memoria e diminuisce la concentrazione di immunoglobuline nel siero, questo rappresenta il quadro caratteristico della CVID. Alcuni pazienti CVID con mutazioni di ICOS hanno normali livelli di IgM o dimostrano un aumento transiente del livello di IgM in seguito ad episodi di infezioni acute, ma non presentano livelli di IgG e IgA. La regione cromosomica 2q33 è stata associata in molti studi a malattie autoimmuni comuni quali le tiroiditi, la sclerosi multipla e malattie immuno mediate quali il morbo celiaco. Recentemente sono stati pubblicati diversi lavori inerenti il coinvolgimento di ICOS nelle malattie autoimmuni, sia dal punto di vista genetico che funzionale. Variazioni del gene ICOS possono agire come fattori di suscettibilità allo sviluppo della Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS), rara malattia autoimmune ereditaria causata da difettiva funzionalità di Fas. Nei pazienti con 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. 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.)

Recentemente nel nostro laboratorio è stata confermata l'associazione tra un aplotipo formato da SNPs del gene di ICOS nella regione 3'UTR, e come possa influenzare da un lato l'espressione di ICOS e la risposta T linfocitaria, e dall'altro la suscettibilità alla SM e il suo decorso clinico.

Scopo di questo lavoro è stato quindi quello di valutare se variazioni di ICOS, già studiate per la sclerosi multipla, potessero giocare un ruolo, non solo nello sviluppo dell'ALPS, ma anche in quello della CVID.

Abbiamo valutato tutti i polimorfismi presenti in letteratura nell'esone 5 e nel 3'UTR, in 29 pazienti ALPS, 75 pazienti CVID e 82 controlli. Da questa analisi è risultato significativo il polimorfismo +2373 C/G del 3'UTR nella popolazione di pazienti ALPS,

contrariamente a quanto era risultato nella SM; la sua presenza aumenta quindi il rischio di sviluppare la malattia di circa 3 volte ($p=0.010$ OR=2.65 CI=1.23-5.69). Se la popolazione dei pazienti viene suddivisa tra ALPS e DALD si può osservare che il polimorfismo +2373 C/G risulta essere significativo solo nella popolazione ALPS ($p=0.0084$ OR=3.76 CI=1.30-10.84).

Anche tutti i 75 pazienti CVID sono stati sequenziati valutando tutti i polimorfismi ma nessuno è risultato significativo, quindi si può supporre che non siano coinvolti nella suscettibilità alla malattia.

L'analisi attraverso un software statistico (Haploview) che calcola le possibili combinazioni aplotipiche in base ai dati ottenuti dal sequenziamento della popolazione di pazienti e da quella dei controlli sani, ha evidenziato tre aplotipi già precedentemente trovati nella sclerosi multipla, con l'eccezione dello SNP +2373 C/G, significativo nei pazienti ALPS, che non risulta essere il linkage con gli altri (+602 A/C, +930 G/A, +1459 A/T, +1564 T/C, +1624 C/T, +1862 A/G, +2007 A/G); questo potrebbe significare che il polimorfismo possa essere in linkage con altre variazioni, o che solo esso sia coinvolto nella suscettibilità alla malattia. I differenti aplotipi non raggiungono la significatività statistica dato il ridotto numero dei soggetti coinvolti nello studio.

Inoltre è stato confermato che esiste un forte linkage disequilibrium tra i polimorfismi della regione 3'UTR. In futuro si pensa di ampliare la casistica dei pazienti ALPS e dei controlli per meglio definire i dati ottenuti fino ad ora; infine si cercherà di chiarire l'effetto dei polimorfismi del gene ICOS sull'espressione e funzionalità della molecola.

BIBLIOGRAFIA

1. Ashkenazi A., Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308, 1998
2. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365, 1997.
3. Baker S.J., Reddy E.P. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17, 3261-3270, 1998

4. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien, RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288(5475):2354-2357, 2000
5. Griffith T.S., Brunner T., Fletcher S.M. et al. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270, 1189-1192, 1995.
6. Gomez-Angelats M, Cidlowski JA. Protein Kinase C Regulates FADD Recruitment and Death-inducing Signaling Complex Formation in Fas/CD95-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276(48):44944-44952, 2001
7. Medema J.P, C. Scaffidi, F.C. Kischkel, A. Shevchenko, M. Mann, P. H. Krammer, M. E. Peter FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *The EMBO Journal* 16 10: 2794-2804, 1997.
8. Los M, C. Stroh, R. U. Janiche, I. H. Engels, K. Schulze-Osthoff Caspases:more than just killers? *Trends in Immunology* Vol.22 No.1, 2001.
9. Hofmann TG, Moller A, Hehner SP, Welsch D, Droge W, Schmitz ML. CD95-induced JNK activation signals are transmitted by the death-inducing signaling complex (DISC), but not by Daxx. *Int. J. Cancer* 93(2):185-191, 2001
10. Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.* 276(23), 2001
11. Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312, 1998.
12. Bossy-Wetzel E., Green D.R. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mut. Res.* 434, 243-251, 1999.
13. Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssiere J.C., Mignotte B.: The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* 9, 1277-1287, 1995.
14. Desagher S, J.C. Martinou. Mitochondria as the central control point of apoptosis, *Trend in Cell Biology* 10, 2001
15. De Maria R., Lenti L., Malisan F. et al.: Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science* 277, 1652-1655, 1997.
16. Hu Y., Benedict M.A., Wu D. et al. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4386-4391, 1998.
17. Li P., Nijhawan D., Budihardjo I. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489, 1997.
18. Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J.: Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94(4), 491-501, 1998.
19. Luo X. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490, 1998.
20. Thornberry N.A., Lazebnik Y. Caspases:enemies within. *Science* 281, 1312-1316, 1998.
21. Kumar S. Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Diff.* 6, 1060-1066, 1999.
22. Slee E.A., Adrian C., Martin S.J. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Diff.* 6, 1067-1074, 1999.

23. Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr. Opin. Immunol.*;10(5):581-7, Oct 1998.
24. Trapani JA, Sutton VR, Smyth MJ. CTL granules: evolution of vesicles essential for combating virus infections. *Immunol. Today* 20(8):351-6, Aug 1999
25. Sharma K., Wang R.X., Zhang L.Y., Yin D.L., Luo X.Y., Solomon J.C., Jiang R.F., Markos K., Davidson W., Scott D.W., Shi Y.F. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol. Ther.* 88(3), 333-347, 2000.
26. Ricci-Vitiani L., Conticello C., Zeuner A., De Maria R. CD95/CD95L interactions and their role in autoimmunity. *Apoptosis* 5(5), 419-424, 2000.
27. Mountz J.D., Cheng J., Su X., Wu J., Zhou T. Autoimmunity, apoptosis defects and retroviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 374, 183-201, 1995.
28. Goldsby R.A., Kindt T.J. and Osborne B.A. *Kuby Immunologia*. 2nda Edizione 2000
29. Adachi M., Suematsu S., Kondo T. et al.: Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in the peripheral lymphoid organs and liver. *Nature Genet.* 11, 294-300, 1995.
30. Wu J., Zhou T., Zhang J. et al.: Correction of accelerated autoimmune disease by bearly replacement of the mutated *lpr* gene with the normal Fas apoptosis gene in the T cells of transgenic MLR-*lpr/lpr* mice. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91, 2344-2348, 1994.
31. Fisher GH, Rosemberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ and Puck JM. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome., *Cell.*, 81:935-946, 1995
32. Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome., *Ann Intern Med.*, 130(7): 591-601, 1999
33. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science.*;268:1347-1349, 1995
34. Drappa J., Vaishnaw A.K., Sullivan K.E. et al.: Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Engl J Med* 335, 1643-1649, 1996.
35. Bettinardi A., Brugnani D., Quiros-Roldan E. et al.: LD. Missense mutations in the Fas gene resulting in autoimmune lymphoproliferative syndrome: a molecular and immunological analysis. *Blood* 89, 902-909, 1997.
36. Fleisher TA, Puck JM, Strober W, Dale JK, Lenardo MJ, Siegel RM, Straus SE, Bleasing JJ. The autoimmune lymphoproliferative syndrome. A disorder of human lymphocyte apoptosis. *Clin Rev Allergy Immunol.*, 20(1):109-20, 2001.
37. Jackson CE, Puck JM. Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis. *Curr Opin Pediatr.*, 11(6):521-527, 1999.
38. Choi Y, Ramnath VR, Eaton AS, Chen A, Simon-Stoos KL, Kleiner DE, Erikson J, Puck JM. Expression in transgenic mice of dominant interfering Fas mutations: a model for human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clin Immunol.*, 93(1):34-45, 1999

39. Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, Sneller M, Yao X, Puck JM, Straus SE, Lenardo MJ. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell.*, 98(1):47-58, 1999
40. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor, *Science.*;267:1449-1456, 1995
41. Dianzani U, Bragardo M, DiFranco D, Alliaudi C, Scagni P, Buofiglio D, Redoglia V, Bonissoni S, Correr A, Dianzani I, Ramenghi U. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferations., *Blood.*, 89:2871-2879, 1997.
42. Dianzani U, Chiochetti A, and Ramenghi U. Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity. *Life Sciences.*;72:2803-2824, 2003.
43. Ramenghi U, Bonissoni S, Migliaretti G, et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. *Blood.*;95:3176-3182, 2000
44. DeFranco S., Bonissoni S., Cerutti F., Bona G., Bottarel F., Cadario F., Brusco A., Loffredo G., Rabboni I., Corrias A., Pignata C., Ramenghi U., Dianzani U. Defective function of Fas in patients with type 1 diabetes associated with other autoimmune diseases. *Diabetes.*50(3):483-8, Mar 2001.
45. Comi C., Leone M., Bonissoni S., DeFranco S., Bottarel F., Mezzatesta C., Chiochetti A., Perla F., Monaco F., Dianzani U. Defective T cell Fas function in patients with multiple sclerosis. *Neurology.*;55(7):921-7, Oct 10 2000 .
46. Bona G., DeFranco S., Chiochetti A., Indelicato M., Biava A., Di franco D., Dianzani I., Ramenghi U., Corrias A., Weber G., De Sanctis V., Mughetti I., Radetti G., Dianzani U. Defective function of Fas in T cells from pediatric patients with autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol.*;133(3):430-7, Sept 2003.
47. Salomon B, Bluestone JA. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annual Review Immunology.*, 19:225-252, 2001
48. Alegre ML, Noel TJ, Eisfelder BJ, Chuang E, Clark MR, Reiner SL, Thompson CB. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA-4 on mouse T-cell. *The Journal of Immunology.*, 157:4762-4770, 1996
49. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4., *Immunity.*, 3:541-547, 1995.
50. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor., *Immunity.*, 11(2):141-151, 1999.
51. Finger LR, Pu J, Wasserman R, Vibhakar R, Louie E, Hardy RR, Burrows PD, Billips LG. The human PD-1 gene: complete cDNA, genomic organization, and developmentally regulated expression in cell progenitors., *Gene.*, 197(1-2): 177-187, 1997.

52. Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten is essential for embryonic development and tumor suppression., *Nature Genetics.*, 19(4): 348-355, 1998.
53. Marsh DJ, Coulon V, Lunetta KL, Rocca-Serra P, Dahia PL, Zheng Z, Liaw D, Caron S, Duboue B, Lin AY, Richardson AL, Bonnetblanc JM, Bresieux JM, Cabarrot-Moreau A, Chompret A, Demage L, Eeles RA, Yahanda AM, Fearon ER, Fricker JP, Gorlin RJ, Hodgson SV, Huson S, Lacombe D, Eng C, et al. Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation., *Human Molecular Genetics.*, 7(3): 507-515, 1998.
54. Sutphen R, Diamond TM, Minton SE, Peacocke M, Tsou HC, Rot AW. Severe Lhermitte-Duclos disease with unique germline mutation of PTEN., *American Journal of Medical Genetics.*, 82(4): 290-293, 1999.
55. Di Cristofano A, Kotsi P, Peng YF, Cordon-Cardo C, Elkon KB, Pandolfi PP. Impaired Fas response and autoimmunity in PTEN +/- mice., *Science* 285(5436):2122-2125, 1999
56. Di Cristofano A, Kotsi P, Peng YF, Cordon-Cardo C, Elkon KB, Pandolfi PP. Impaired Fas response and autoimmunity in PTEN +/- mice., *Science* 285(5436):2122-2125, 1999
57. Batten M, Groom J, Cachero TG, Qian F, Schneider P, Tschopp J, Browning JL, Mackay F. BAF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes., *The Journal of Experimental Medicine.*, 192(10):1453-1466, 2000.
58. Thompson JS, Schneider P, Kalled SL, Wang L, Lefevre EA, Cachero TG, MacKay F, Bixler SA, Zafari M, Liu ZY, Woodcock SA, et al. BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population., *The Journal of Experimental Medicine.*, 192(1):129-135, 2000.
59. Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M, Frew E, Scott ML. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway., *Science.*, 293(5537):2111-2114, 2001.
60. Gavin P. Spickett, John Farrant, Margaret E. North, Jiang-gang Zhang, Lynn Morgan and A. David B. Webster. Common variable immunodeficiency: how many diseases?., *Immunology Today*, 325: .., 1997.
61. McCluskey DR. e Boyd NAM. Prevalence of primary hypogammaglobulinaemia in Northern Ireland., *Proc R Coll Physicians Edinb.*, 19: 191-4, 1989.
62. Fasth A. Primary immunodeficiency disorders in Sweden: cases among children, 1974-1979., *J. Clin Immunol.*, 2:86/92, 1982
63. Asherson GL: Late-Onset hypogammaglobulinemia. In: Asherson GL, Webster AD, eds. *Diagnosis and Treatment of Immunodeficiency*. London: *Blackwell Scientific Publications*, 37-60, 1980
64. Cunnigham- Rundles C. Clinical and immunologic analyses of 103 patients with common variable immunodeficiency. *J. Clin Immunol.* 9:22-33, 1989

65. Hermans PE., Diax-Buxo JA, Stobo JD. Idiopathic late-onset immunoglobulin deficiency. Clinical observations in 50 patientis. *Am J Med.* 61.221-36, 1976
66. Michael C. Sneller, Warren Strober, Eli Eisentein; Jonathan S. Jaffe; and Charlotte Cunningham-Rundles. New insights Into Common Variable Immunodeficiency. *Annas of Internal Medicine.* 118: 720-730, 1993
67. Asherson GL: Late-Onset hypogammaglobulinemia. In: Asherson GL, Webster AD, eds. *Diagnosis and Treatment of Immunodeficiency.* London: *Blackwell Scientific Publications,* 37-60, 1980
68. Cunnigham- Rundles C. Clinical and immunologic analyses of 103 patients with common variable immunodeficiency. *J. Clin Immunol.* 9:22-33,1989
69. Hermans PE., Diax-Buxo JA, Stobo JD. Idiopathic late-onset immunoglobulin deficiency. Clinical observations in 50 patientis. *Am J Med.* 61.221-36, 1976
70. Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 1996; 85: 299-302
71. Hogancamp WE, Rodriguez M, Weinshenker BG. The epidemiology of multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc* 1997; 72(9): 871-878
72. . Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci* 2001;22(2): 117-139
73. . Sotgiu S, Pugliatti M, Sanna A, Sotgiu A, Castiglia P, Solinas G, Dolei A, Serra C, Bonetti B, Rosati G. Multiple sclerosis complexity in selected populations: the challenge of Sardinia, insular Italy.*Eur J Neurol* 2002; 9(4): 329-341
74. Serra C, Sotgiu S, Mamei G, et al. Multiple sclerosis and multiple sclerosis-associated retrovirus in Sardinia. *Neurol Sci* 2001; 22: 171-173
75. Garson JA, Tuke PW, Giraud P, et al. Detectin of virion-associated SMRV-RNA in serum of patients with multiple sclerosis. *Lancet* 1998; 351: 33
76. Haidl S, et al. Guillain-Barré syndrome after C. Pneumoniae infection. *N Engl J Med* 1992; 326: 576-577
77. Kosma P. Chlamidial LPS- a review. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1455: 385-402
78. Scolding NJ, Zajicek JP. Compston DAS The pathogenesis of demyelinating disease. *Prog Neurobiol* 1994; 43: 143-173
79. Dean G, and Kurtzke JF. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med J* 1971; 3: 725-729
80. Alter M, Leibowitz U, and Speer J. Risk of multiple sclerosis related to age at immigration to Israel. *Arch Neurol* 1966; 15: 234-237
81. Kurtzke JF. SM epidemiology worldwide. One view of current status. *Acta. Neurol. Scand Suppl* 1995; 161: 23-33
82. Weinshenker, B.G., 1995. The natural history of multiple sclerosis. *Neurol. Clin.* 472. 13,119–146.
83. Ebers GC, Dyment DA. Genetics of multiple sclerosis. *Semin Neurol* 1998; 18(3): 295-299
84. Tienari PJ, Wikstrom J, Sajantila A, Palo J, Peltonen L. Genetic susceptibility to multiple sclerosis linked to myelin basic protein gene. *Lancet* 1992; 340(8826): 987-991

85. Ebers GC, Sadovnick AD, and Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. *Nature* 1995; 377: 50-51
86. Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood H, Thorpe JW, Miller DH, Compston DA. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology* 1994 44(1): 11-15
87. . Johnson R, Gibbs C. Koch' s postulates and slow infestions of the nervous system. *Arch Neorol* 1974; 30: 36-38
88. Kurzke JF, Gudmundsson K, Bergmann S. Multiple sclerosis in Iceland . I. Evidence of a postwar epidemic. *Neurology* 1982; 32: 143-150
89. . Wolinsky JS. Progressive rubella panencephalitis. In: McKendall RR (ed.), *Viral Disease. Handbook of Clinical Neurology*, New Series, Vinken PJ, Bruyn GW, Klawans HL(series eds.). Chapter 25, 1988; 56: 401-416
90. Ablashi DV, Lapps W, Kaplan M, et al. Human herpes virus-6 (HHV-6) infection in multiple sclerosis: a preliminary report. *Mult Scler* 1998; 4: 490-496
91. . Nielsen L, Larsen AM, Munk M, Vestergaard BF. Human herpes virus-6 immunoglobulin G antibodies in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1997; (suppl) 169: 76-
92. Soldan SS, Berti R, Salem N, et al. Association of human herpes virus-6 (HHV-6) with multiple sclerosis: Increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med* 1997; 3: 1394-1399
93. Bech E, Lycke J, Gadenberg P, et al. A randomized, double blind, placebo controlled MRI study of anti-herpes virus therapy in SM. *Neurology* 2002; 58: 31-36
94. Johnston JB, Silva C, Holden J, et al. Monocyte activation and differentiation augment human endogenous retrovirus expression: implication for inflammatory brain diseases. *Ann Neurol* 2001; 50: 429-430
95. Fryden A, Kihlstrom E, Mallet R. A clinical and epidemiologic study or ornithisis caused by *C. pneumoniae* and *C. psittaci*. *Scand J Infect* 1989; 21: 681-691
96. Sundelof B, Gnarpe H, Gnarpe J. An unusual manifestation of *C. pneumoniae* meningitidis. *Scand J Infect Dis* 1993; 25: 259-261
97. Socan M, Beovic B, Kesse D. *C. pneumoniae* associated meningoencephalilitis. *N Engl J Med* 1994; 331: 406
98. Koskiniemi M, et al. *C. Pneumoniae* associated with CNS infectons. *Eur J Neurol* 1996;36: 160-163
99. Guiglelminotti J, Lellouche N, Maury E. Severe meningoencephalitis an unusual manifestation of *C. pneumoniae* infection. *Clin Infct Dis* 2000; 30 : 209-210
100. Haidl S, et al. Guillain-Barré syndrome after *C. Pneumoniae* infection. *N Engl J Med* 1992; 326: 576-577
101. Coyle, A. J., S. Lehar, C. Lloyd, J. Tian, T. Delaney, S. Manning, T. Nguyen, 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. 2000. *Immunity*. 13:95-105.
102. Tafuri, A., A. Shahinian, F. Bladt, S. K. Yoshinaga, M. Jordana, A. Wakeham, L. M. Boucher, D. Bouchard, V. S. Chan, G. Duncan, B. Odermatt, A. Ho, A. Itie, T.

- Horan, J. S. Whoriskey, T. Pawson, J. M. Penninger, P. S. Ohashi, and T. W. Mak. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. 2001. *Nature* 409:105-109.
103. Salzer u.,Maul-Pavicic a.Urschel S.,Belohradsky B., Litzman J., Holm A.,Franco J., Plebani A., Hammarstrom L., Skrabl A., Schwinger W., Grimbacher B. ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. 2004. *Clinical Immunology* 113:234-240.
104. Laursen L, Schjebel L., Jacobsen K., Permin H., Svejgaard A., Barington T., Normal ICOS, ICOSL and AID alleles in Danish patients with common variable immunodeficiency. *Scandinavian Journal of Immunology* 61:566-574

ATTIVITA' FORMATIVA SVOLTA:

- Corso di Inglese. Docente: Prof. Irving Bell
- Corso di Statistica Medica. Docente: Prof. Magnani.

SEMINARI INTERNI AL DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE ANNO ACCADEMICO 2006/07

10 Gennaio 2007: Gene silencing by RNA interference (RNAI). Prof.ssa Paola Defilippi

12 Gennaio 2007: Autoantibodies in systemic sclerosis: from clinical subsets to pathogenetic functions. Prof. Chizzolini

17 Gennaio 2007: Detection of MIRNA target genes through statistical analysis of DNA motifs in human-mouse 3'-UTR regions. Prof. Michele Caselle

18 Gennaio 2007: Patogenesi del diabete mellito di tipo I stiamo perdendo o stiamo vincendo?. Prof.Franco Bottazzo

1 Febbraio 2007: Gene Therapy strategies for Phenylketonuria. Prof. Beat Thony

15 Febbraio 2007: The long hand of the small RNAs reaches into several levels of gene regulation. Prof.Carlo Cogoni

19 Febbraio 2007: Human Cytomegalovirus (HCMV) from clinic to the bench and return. Prof. Thomas Mertens

22 Febbraio 2007 : La valutazione del controllo nervoso della circolazione in clinica:dalla teoria alle applicazioni pratiche. Prof. Massimo Pagani

22 Febbraio 2007: Fragile X sindrome from RNA metabolism impairment to spine dysmorphogenesis. Prof. Claudia Bagni

9 Marzo 2007: Vita opere e miracoli dell'epatocita. Prof. Marco Tripodi

14 Marzo 2007: Protein Microarrays development of new supports for improved sensitivity. Dr. Marina Cretich

15 Marzo 2007: Le colangiopatie autoimmuni. Prof. Podda

16 Marzo 2007: Microarrays di tessuti:una strategia per identificare nuovi biomarcatori tumorali. Dott.ssa Maria Capra

16 Marzo 2007: Drosophila as a model for aging and cancer. Prof. Dirk Bohmann

29 Marzo 2007: Marcatori farmacogenomici nel carcinoma coloretta:quali prospettive per una terapia personalizzata? Prof. Mini

12 Aprile 2007: Protein data base. Dr. Marco Milanesio

19 Aprile 2007: Pathogenic viruses: smart manipulators of the Interferon system. Prof. Otto Haller

16 Maggio 2007: Difetti genetici del pre-B Cell Receptor. Dr.ssa Ferrari

25 Maggio 2007: The regulation of hematopoietic stem cells by SMAD signaling. Prof. Stefan Karlsson

28 Maggio 2007: Translating basic science into therapeutic strategies for "Shwachman Diamond syndrome". Prof. Steve Ellis

4 Giugno 2007: Sindromi autoinfiammatorie. Prof. Martini

14 Giugno 2007: La genesi dei Gliomi e i suoi risvolti prognostici e terapeutici. Prof. Schiffer

21 Giugno 2007:Bioinformatics tools for the analysis of UTRs and for the prediction of alternative spliced transcripts". *Dott.Flavio Mignone*

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI

5° Congresso Nazionale della Società Italiana di Immunologia, Immunologia clinica e Allergologia (SIICA), Trieste, 6-9 giugno 2007).

PUBBLICAZIONI:

A sequence variation in the MOG gene is involved in Multiple Sclerosis susceptibility.

D'Alfonso S, Bolognesi E, Guerini FR, Barizzzone 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)

Variation of the perforin gene in patients with multiple sclerosis

Giuseppe Cappellano, MS¹, Cristoforo Comi, PhD, MD^{2,3}, Elisabetta Orilieri, MS¹, Annalisa Chiocchetti, PhD, MS¹, Sara Bocca, MS¹, Elena Boggio, MS¹, Ilaria Seren Bernardone, MS¹, Angela Cometa, PhD⁴, Rita Clementi, MD¹, Nadia Barizzzone, MS¹, Sandra Dalfonso, MS¹, Mara Giordano, MS¹, Daniela Galimberti, PhD⁵, Elio Scarpini, MD⁵, Franca R. Guerini, PhD⁶, Domenico Caputo, MD⁶, Damiano Paolicelli, MS⁷, Maria Trojano, MD⁷, Lorenzo Figà-Talamanca, MS⁸, Marco Solvetti, MS⁸, Franco Perla, MD⁹, Maurizio Leone, MD¹, Francesco Monaco, MD² and Umberto Dianzani, PhD, MD¹.(submitted)

ABSTRACT A CONGRESSI:

- **Ricerca di nuovi geni di suscettibilità alla sclerosi multipla nella regione del complesso maggiore di istocompatibilità**

D'Alfonso S, Bolognesi E, Guerini F.R, **Bocca S**, Ballerini C, Bonissoni S, Ferrante P, Trojano M, Momigliano Richiardi P. (VII Congresso Internazionale della Società Italiana di Genetica Umana (S.I.G.U.), Pisa, Palazzo Congressi, 13-15 ottobre 2004);

- **Icos gene haplotypes correlate with IL10 secretion and multiple sclerosis evolution**

Sara Bocca, Cristoforo Comi, Luca Castelli, Elisa Cerutti, Stefania Nicola, Riccardo Mesturini, Umberto Dianzani (5° Congresso Nazionale della Società Italiana di Immunologia, Immunologia clinica e Allergologia (SIICA), Trieste, 6-9 giugno 2007). POSTER