

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



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

Relazione 2° anno

**VARIAZIONI DEL GENE DI PERFORINA NEI
PAZIENTI CON SCLEROSI MULTIPLA**

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

INTRODUZIONE

Aspetti generali dell'autoimmunità.

I sistemi di tolleranza al *self*, che normalmente proteggono ciascun individuo dai linfociti potenzialmente autoreattivi, possono in certi casi fallire. Questi fallimenti portano allo sviluppo di una risposta inappropriata del sistema immunitario contro tessuti *self*, fenomeno chiamato autoimmunità. Negli anni '60 si riteneva che tutti i linfociti autoreattivi fossero eliminati durante la maturazione linfocitaria e che le malattie autoimmuni fossero l'inevitabile conseguenza di errori nel processo di delezione delle cellule autoreattive negli organi linfatici primari. A partire dalla fine degli anni '70 sono state ottenute numerose evidenze sperimentali in contrasto con questo modello. Infatti, linfociti autoreattivi maturi circolanti sono normalmente presenti nei soggetti sani normali.

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

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

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

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

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

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

vasta indirizzata sia verso epitopi diversi della stessa proteina sia verso proteine diverse (espansione epitopica).

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

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

Molte malattie autoimmuni presentano un certo grado di familiarità. Questo ha indotto lo svolgimento di una enorme mole di studi volti a definire i fattori genetici coinvolti nel loro sviluppo. Nel loro complesso i dati ottenuti disegnano il quadro tipico delle malattie multifattoriali in cui un insieme di geni diversi possono influire nella suscettibilità genetica allo sviluppo della malattia, che richiede comunque l'induzione da parte di fattori scatenanti. Molti studi genetici hanno evidenziato l'associazione statistica di malattie autoimmuni con particolari polimorfismi di specifici geni, ovvero è stato dimostrato che una certa malattia autoimmune è più frequente nei portatori di un determinato allele di un certo gene. Tuttavia spesso non è chiaro se questi geni siano

coinvolti direttamente nello sviluppo della malattia oppure se l'associazione statistica sia legata a fenomeni di linkage disequilibrium, ovvero al fatto che un allele si associa frequentemente ad un particolare allele di un altro gene non noto, posto per lo più in vicinanza al primo e coinvolto nella genesi della malattia.

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

La sclerosi multipla (SM).

Epidemiologia.

La Sclerosi Multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica del sistema nervoso centrale (SNC). Se si escludono i traumi, è la causa più frequentemente responsabile di disabilità neurologica nei giovani adulti. E' più frequente nel sesso femminile, e il rapporto femmine/maschi varia da 1,9 a 3,1. L'esordio è raro prima dell'adolescenza situandosi in genere fra i 20 e i 45 anni, con un picco d'incidenza per età intorno ai 30 anni.

E' diffusa in tutto il mondo, ma numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato una disomogeneità nella sua distribuzione geografica.

Si possono individuare zone ad alto rischio, con tassi di prevalenza uguali o superiori a 30 casi di SM definita per 100000 abitanti, comprendenti gli USA settentrionali, il Canada meridionale, l'Europa centro-settentrionale, l'Australia sud-orientale e la Nuova Zelanda; zone a medio rischio, con tassi compresi tra 5-25/100000, comprendenti l'Europa mediterranea, gli USA meridionale la popolazione bianca del Sud Africa; ed infine, zone a basso rischio, con tassi inferiori a 5/100000 comprendenti Asia, Africa, gli stati settentrionali del Sud America e i Carabi. In Italia la prevalenza è compresa tra 7 e 30 casi per 100000.

Eziologia.

La causa della SM non è ancora stata chiarita, e diversi studi suggeriscono si tratti di una patologia multifattoriale che dipende da fattori ambientali, genetici, immunologici.

Fattori genetici.

L'esistenza di una suscettibilità geneticamente determinata a contrarre la malattia è suggerita principalmente da studi epidemiologici condotti in popolazioni di origine nordeuropea. E' stato osservato che la concordanza tra gemelli monozigoti è del 25-30%, circa 9 volte maggiore rispetto a quella dei gemelli dizigoti (4%) [1-2]. Questa elevata incidenza tra i gemelli monozigoti dimostra il ruolo dei fattori genetici nell'eziologia della malattia, sebbene il 70% di discordanza sottolinei l'importanza dei fattori ambientali.

La rilevanza di una suscettibilità genetica viene anche confermata da una incrementata incidenza familiare: circa il 15% dei casi di SM hanno un familiare o un parente affetto; il rischio di contrarre la malattia è più alto nei fratelli di soggetti con SM e gradualmente diminuisce nei figli e più ancora nei cugini. Si può ritenere che per parenti di primo grado esista un rischio di circa l'1-3% di contrarre la malattia rispetto al rischio di 1/1000-2000 nella popolazione generale. Tale incidenza potrebbe essere in parte dovuta a fattori ambientali più uniformi nell'ambito di uno stesso nucleo ma dati ottenuti in coniugi e figli adottati, suggeriscono che fattori ambientali familiari non incidono sostanzialmente sull'aggregazione familiare della SM.

Studi di linkage hanno evidenziato come il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) sul cromosoma 6 rappresenti un determinante antigenico della SM [3-4]. Tale complesso codifica per gli antigeni di istocompatibilità (sistema HLA) che presentano l'antigene ai linfociti T. La regione di classe II (HLA-D) dell'MHC presenta la più stretta associazione con la SM e la suscettibilità genetica sembra essere dovuta alla presenza dell'allele DR2 e del relativo aplotipo, definito sulla base di criteri molecolari come DRB1*1501, DQA1*0102, DQB1*0602. I tentativi

di localizzare più precisamente il gene di suscettibilità, all'interno della regione DR-DQ, sono stati infruttuosi a causa del notevole "linkage disequilibrium" in questa regione.

Nella popolazione caucasica la malattia è spesso associata agli allotipi HLA-DR2 e DQW1 del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II. In altre etnie tuttavia la malattia è associata a differenti allotipi HLA, quali ad es., in Sardegna, all'HLA -DR4 e DQW3.

Oltre alla regione HLA, alcuni studi hanno ipotizzato l'esistenza di altri geni di suscettibilità, tra cui quello per la catena β del TCR sul cromosoma 7 [5], quello per la catena pesante delle immunoglobuline sul cromosoma 19, un gene correlato alla proteina basica della mielina sul cromosoma 18 [6], ma per nessuno di questi è stata mostrata una associazione significativa.

Studi di linkage in alcune popolazioni, hanno evidenziato la presenza di polimorfismi di diverse molecole tra cui IL10, IL1, l'apolipoproteina E, CTLA4 che pur non associandosi alla suscettibilità per la malattia rappresentano un fattore di rischio per sviluppare un quadro clinico più severo [7-10].

Nessuna associazione è stata riscontrata tra i polimorfismi descritti in letteratura delle molecole apoptotiche bax, bcl-x, bcl-2, p53 e SM [11].

Nuove informazioni sulla genetica della SM giungono da tecnologie d'avanguardia come i microarrays. Con questa tecnica, infatti, Steinman et al. hanno indicato la citochina osteopontina (OPN) come gene sovraespresso nella malattia [12]. Studi recenti, hanno evidenziato che alcuni alleli del gene di OPN e alcuni allotipi del gene di ICOS sono capaci di favorire lo sviluppo della SM. [13-14].

Fattori virali

Per molti anni l'ipotesi infettiva, in particolare virale, è stata considerata importante nella genesi della SM sulla base di osservazioni epidemiologiche e di caratteristiche patologiche della malattia. Numerosi dati suggeriscono il ruolo di un agente virale nella patogenesi della SM: a) l'evidenza epidemiologica di una esposizione a agenti infettivi nel periodo dell'infanzia e dell'adolescenza; b) l'induzione di esacerbazioni della malattia da parte di infezioni virali [15]; c) la distribuzione geografica della suscettibilità alla SM [16]; d) gli studi di migrazione da e verso aree ad alta suscettibilità; e) la ridotta risposta immune verso virus [17], f) analogie con modelli animali e altre patologie umane in cui i virus sono responsabili di malattie a lunga incubazione, demielinizzanti e con andamento recidivante-remittente.

Come accennato la suscettibilità alla SM segue una distribuzione geografica con un aumento di prevalenza all'aumentare della latitudine che potrebbe suggerire la rilevanza di fattori ambientali e genetici.

Studi di migrazione condotti prevalentemente su Europei immigrati in Sud Africa, Israele, Hawaii [18-19] dimostrano che le popolazioni migranti tendono a conservare il rischio della zona di origine quando la migrazione avviene dopo il 15° anno di vita, mentre al contrario acquistano il rischio del nuovo paese di residenza quando la migrazione avviene prima dei 15° anno di vita. Questi dati suggeriscono che fattori ambientali, forse virali, agiscono prima dei 15 anni per influenzare la suscettibilità alla SM.

Prove a favore di questa ipotesi patogenetica si ricavano anche da dati relativi ad epidemie di SM. Storica è quella che si è verificata nelle isole Faroe, dove la malattia era sconosciuta fino al 1940 e dove si sono avuti numerosi casi durante e subito dopo la seconda guerra mondiale, in concomitanza con l'occupazione da parte delle truppe britanniche. L'improvvisa comparsa della SM in questa popolazione suggerisce una trasmissione inter-umana o comunque l'importanza di agenti infettivi [20]. Altri casi di epidemie sono stati descritti nelle isole Shetland-Orkney, Iceland, Key West Florida, Mossyrock Washington e Mansfield Massachusetts [21].

Numerose sono le patologie demielinizzanti del SNC causate da virus sia nell'uomo che negli animali. Esempi descritti in letteratura sono: la leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) con il papovavirus JC, la panencefalite subacuta sclerosante (SSPE) con il virus del morbillo e la paraparesi spastica tropicale con il HTLV-1 (Human T-cell lymphotropic virus). L'associazione di virus con patologie demielinizzanti sono prove a favore di una possibile influenza virale nello sviluppo di SM; in particolare indicano che i virus sono in grado di causare demielinizzazione e possono persistere per anni nel SNC inducendo una patologia cronica molti anni dopo l'infezione acuta.

Tra i virus chiamati in causa nella genesi della SM troviamo il virus del morbillo, l'herpesvirus simplex (HHV-1), l'herpesvirus umano 6 (HHV-6), il virus Epstein-Barr, il Rubivirus, il virus Parainfluenzae, il retrovirus HTLV, il retrovirus associato alla sclerosi multipla (MSRV) mentre tra i microrganismi non virali abbiamo l'Acanthamoeba, la Borrelia, la Brucella, il Campylobacter, la Chlamydia pneumoniae. Per questi patogeni è stata ipotizzata un'associazione con la SM sulla base di studi che indicano aumenti del titolo anticorpale sierico e liquorale contro questi microrganismi nei pazienti con SM rispetto ai controlli sani [22-25].

Il ruolo di questi patogeni nella genesi della SM rimane sconosciuto. E' possibile che l'agente iniziale possa essere virale, ma anche in tale eventualità si pensa che intervengano successivamente meccanismi autoimmuni responsabili del danno tissutale e della cronicizzazione

della malattia. Alcuni virus e batteri possiedono determinanti antigenici identici o simili a normali componenti delle cellule. Questo fenomeno noto come “mimetismo molecolare” potrebbe rappresentare uno dei meccanismi capaci di innescare la risposta autoimmune. Per esempio, l'encefalite allergica sperimentale (EAE) viene indotta immunizzando l'animale con proteine della mielina ed è mediata dai linfociti CD4+ reattivi verso la MBP [26]. La MBP condivide omologie di sequenza con proteine prodotte dai virus del morbillo, dell'influenza e dell'adenovirus. L'infezione da parte di virus esprimenti epitopi simili a componenti *self* sequestrate potrebbe quindi indurre una reazione autoimmune nei confronti di queste ultime.

Purtroppo la ricerca di un virus che si associ inequivocabilmente alla SM non ha portato risultati. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che non esiste un solo virus che induce la malattia oppure che non è stato ancora identificato [27].

In alternativa, si può pensare che un patogeno ubiquitario possa agire come agente scatenante che contribuisce all'insorgere ed al perpetuarsi di fenomeni di autoaggressione del sistema immunitario in individui geneticamente predisposti.

Fattori immunologici .

Un insieme di dati clinici e sperimentali supportano l'ipotesi che si tratti di una malattia a genesi autoimmune. In particolare, questa ipotesi si fonda sulle seguenti osservazioni: a) nel contesto delle lesioni demielinizzanti sono presenti cellule infiammatorie [28-29]; b) la suscettibilità alla malattia è legata a geni importanti per il controllo della risposta immunitaria [30]; c) il decorso della malattia può essere modificato da terapie immunomodulanti [31-32]; d) si riscontrano alterazioni immunitarie quali la presenza di anticorpi oligoclonali nel liquor [33].

Una delle indicazioni più attendibili in favore di questa ipotesi è costituita dalle analogie cliniche e neuropatologiche con l'EAE [34].

L'EAE viene indotta attivamente, immunizzando l'animale suscettibile con proteine della mielina, oppure passivamente attraverso il trasferimento adottivo di linfociti T encefalito-genici specifici per tali proteine [35-36]. E' mediata dai linfociti T CD4+ reattivi verso un epitopo dominante della proteina basica della MBP nell'ambito del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II. Si pensa che queste cellule appartengano alla popolazione linfocitaria Th1, caratterizzata dalla secrezione delle citochine proinfiammatorie IL2, INF- γ , TNF- α . Al contrario, si ottiene un beneficio terapeutico in molti modelli animali di EAE bloccando la via di trasduzione mediata dal TNF- α e polarizzando le cellule verso un fenotipo Th2.

Nonostante ciò, recenti studi hanno dimostrato come l'EAE e la SM non siano un esempio di univoca risposta Th-mediata ma che il meccanismo alla base sia più complesso. Infatti topi knockout per INF- γ o per TNF- α sviluppano comunque una EAE anche se con una suscettibilità e severità diverse dai topi wild-type [37-38].

Nell'uomo, i risultati ottenuti dall'analisi molecolare della risposta T contro la MBP, hanno evidenziato che numerose porzioni della proteina possono essere riconosciute, nell'ambito di diverse molecole del complesso maggiore di istocompatibilità, da molteplici famiglie del TCR. Tali risultati che discordano da quanto osservato nella EAE in cui la risposta immune è diretta contro un epitopo immunodominante, probabilmente sono dovuti alla profonda differenza genetica tra i roditori di laboratorio (ceppi "inbred") e l'uomo (specie "outbred").

Gli interventi sperimentali di terapia immunologica nell'uomo si sono focalizzati sul blocco dei cloni T CD4+ contro le proteine della mielina, polarizzando le cellule verso un fenotipo Th2 o bloccando la traduzione del segnale via TNF. Queste strategie molto efficienti nel classico modello EAE, non sono altrettanto valide nell'uomo peggiorando a volte il corso della SM. [39-40].

Anche i meccanismi umorali dell'immunità sembrano essere coinvolti nel danno nervoso. Nei pazienti con SM sono state documentate risposte anticorpali nei confronti di MBP, la glicoproteina associata alla mielina (MAG), la proteina proteo lipidica (PLP) e l' α -B cristallina [41]. E' corretto sottolineare che, ogni iniziale risposta dei linfociti T verso un autoantigene, può scatenare successivamente una risposta più diversificata contro altri autoantigeni, un fenomeno noto come "diffusione di epitopi".

L'importanza di una risposta umorale è indicata dalla presenza di immunoglobuline oligoclonali presenti nel liquor in più del 90% dei casi di SM pur non rappresentando una specificità di questa malattia dal momento che si possono trovare in molte altre patologie infiammatorie del SNC come anche infettive o autoimmuni.

Un ulteriore supporto all'origine autoimmune della malattia è scaturito da uno studio clinico effettuato somministrando INF γ [42]. Questa citochina, somministrata a malati di SM, ha determinato un marcato aumento delle ricadute verosimilmente perché l'INF γ induce l'espressione di antigeni di classe II su cellule residenti nel SNC facilitando la risposta autoimmune.

Patogenesi.

E' universalmente accettato che il sistema immunitario svolga un ruolo chiave nella patogenesi della sclerosi multipla. Le prime evidenze indicavano i linfociti T CD4+ come mediatori chiave nella patogenesi della malattia, grazie a studi condotti sul modello animale murino (EAE) [43]. E' opinione comune che gli eventi iniziali dell'attivazione dei linfociti T avvengano in periferia dove i linfociti T incontrerebbero uno specifico autoantigene presentato da molecole del MHC II in presenza di segnali costimolatori come B7-1 e B7-2 sulle cellule presentanti l'antigene. Queste cellule autoreattive potrebbero essere presenti a livello periferico come linfociti "quiescenti", senza manifestare il proprio potenziale autoaggressivo. Uno stimolo esterno, possibilmente una malattia infettiva, potrebbe attivare questi linfociti. I potenziali meccanismi attraverso i quali eventi del genere potrebbero aver luogo includono: a) la "molecular mimicry", la condivisione di epitopi tra un agente infettivo e molecole del SNC; b) un'attivazione policlonale da superantigene o di tipo "bystander" da citochine.

Affinché possa iniziare una risposta immunitaria locale a livello del SNC, i linfociti T circolanti attivati in periferia devono attraversare la barriera ematoencefalica. Il processo di diapedesi attraverso questa struttura, implica una complessa interazione tra a) molecole di adesione, b) chemochine, c) proteasi in grado di alterare la membrana basale, la matrice extracellulare e di degradare la mielina) [44].

Nella fase successiva, i macrofagi e la microglia giocano un ruolo chiave. Questi elementi agiscono come cellule presentanti l'antigene a livello locale, perpetuando la demielinizzazione immunomediata attraverso: a) la fagocitosi, b) il rilascio di citochine, c) l'attivazione di proteasi, d) il rilascio di mediatori tossici.

L'insieme della reazione infiammatoria che aggredisce la mielina a livello del SNC produce demielinizzazione e, successivamente, danno assonale che si suppone essere il correlato patologico del deficit neurologico irreversibile nella SM

Dati recenti dimostrano un importante ruolo dei linfociti CD8+ [45]; esiste infatti una significativa correlazione tra la presenza delle cellule CD8+ ed il danno assonale nelle lesioni sclerotiche [46]. Resta ancora da definire come i linfociti CD8+ contribuiscano alla patogenesi della malattia. Studi su modelli animali hanno suggerito sia un ruolo da "mediatori" che da "soppressori" dell'infiammazione. Nel primo caso, le cellule CD8+ danneggerebbero gli assoni direttamente a seguito del riconoscimento degli epitopi di classe I espressi in superficie dagli assoni stessi o indirettamente, distruggendo le cellule gliali che presentano epitopi di classe I, lasciando gli assoni esposti ad un'altra forma di infiammazione. Nel secondo caso invece, il loro ruolo di "soppressori" si esplicherebbe nel diretto riconoscimento di molecole di classe I sulle

cellule CD4+ [47]. Si ipotizza che il contributo dei linfociti CD8+ al danno assonale venga determinato dal rilascio di “mediatori” e una molecola chiave che potrebbe essere coinvolta in questo processo è perforina.

Perforina: struttura e funzione.

I linfociti T citotossici (CTL) e le cellule natural killer (NK) riconoscono cellule infettate da virus o e/o cellule tumorali e le distruggono attraverso il pathway di perforina e/o altri recettori di morte. Tali pathway costituiscono i meccanismi di sorveglianza immunitaria e di immunoregolazione. I granuli dei linfociti CTL contengono perforina ed altre proteine proapoptotiche (granzimi) che vengono co-secrete per uccidere le cellule bersaglio stesse.

Perforina viene codificata da un gene in singola copia, estremamente conservato dai pesci all'uomo, e mutazioni e/o polimorfismi sono stati descritti nel topo e nell'uomo, ed il loro fenotipo si traduce in una difettiva sorveglianza immunitaria e difettiva immunoregolazione.

Struttura e meccanismo di azione.

Il gene umano di perforina, localizzato sul cromosoma 10q22 è costituito da tre esoni: il primo non tradotto e gli altri due codificanti per una proteina di 555 aminoacidi (67 KDa).

Nella porzione centrale della molecola è presente una regione che mostra un'elevata omologia con la proteina C9 del complemento e si ipotizza che tale dominio formi una α elica anfipatica che permette l'inserimento di perforina nel doppio strato fosfolipidico. Tale dominio è chiamato MAC (“Membrane Attack Complex”) [48]. Inoltre, vi sono lunghe sequenze all'estremità amino-carbossi terminale, uniche in perforina, le quali appaiono estremamente conservate nel corso dell'evoluzione. Gli ultimi 200 aminoacidi della sequenza di perforina costituiscono due domini che sono stati precedentemente identificati in altre proteine: il dominio EGF-like (Epidermal Growth Factor) ed infine il dominio di legame alla membrana C2, calcio dipendente [49]. Inoltre, la proteina contiene due siti di N-glicosilazione e viene sintetizzata come precursore inattivo che processato nel carbossiterminale, rilascia circa 20 aminoacidi e si trasforma in proteina attiva [50]. In seguito alla sintesi nel reticolo endoplasmatico rugoso, le molecole di perforina si spostano attraverso i compartimenti del Golgi dove continua la modificazione post-traduzionale e vengono infine impaccate nei granuli litici dei CTL e delle cellule NK.

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

Dopo che si è formata la sinapsi immunologica tra il linfocita citotossico (CTL e NK) e la cellula infettata dal virus o tumorale, i granuli citotossici si fondono con la membrana dei CTL e riversano il loro contenuto (perforina ed i granzimi) nella sinapsi stessa. [51].

Diverse evidenze suggeriscono che perforina potrebbe avere un ruolo nel rilascio dei granzimi dal compartimento endocitico della cellula bersaglio [52]. I granzimi, in particolare i granzimi A e granzimi B, successivamente inducono l'apoptosi della cellula bersaglio in modo caspasi dipendente e caspasi indipendente.

In realtà, il meccanismo di sinergia tra perforina ed i granzimi non è stato completamente delucidato. Infatti le molecole di granzima possono entrare efficientemente e rapidamente nelle cellule per mezzo dell'endocitosi mediata da recettore [51]. 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 [53].

Infine, 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 [54]. Utilizzando infatti degli inibitori specifici di catepsina B, si assiste al suicidio perforina-dipendente degli stessi CTL e delle cellule NK dopo la degranolazione. Inoltre, i linfociti citotossici non vanno incontro ad autolisi perché l'attivazione di perforina è calcio-dipendente (sono necessari 100 μ M di ioni calcio per permettere il legame alla membrana) e l'ambiente acido dei granuli stessi "protona" i residui di aspartato del dominio C2, leganti il calcio [55].

Il ruolo importante di perforina nel mantenimento dell'omeostasi e della sorveglianza immunitaria è stato delucidato grazie alla generazione di topi *knockout*. Questi topi hanno livelli normali di cellule NK e linfociti T CD8+ e, in assenza di infezioni, sono sani [56].

In caso di infezione, batterica e/o virale, questi animali sviluppano una risposta infiammatoria esagerata, che rappresenta la vera causa di morte. Questi animali sviluppano linfocitopenia emofagocitica con febbre, splenomegalia, emofagocitosi, ipertrigliceridemia e ipofibrinogenemia [57]. I linfonodi e la milza mostrano deplezione dei follicoli secondari. Infiltrati periportalari sono presenti nel fegato e il midollo osseo mostra ipoplasia. I topi hanno elevati livelli di IL-6, IL-10, IL-18, M-CSF, INF- α , INF- γ e TNF- α , e anticorpi diretti verso INF- γ prolungano la sopravvivenza e prevengono lo sviluppo di infiltrati istiocitici e il quadro citopenico.

La caratterizzazione della linfoistocitosi emofagocitica nei topi perforina-deficienti ha permesso a questi studiosi di creare un modello per spiegarne la patogenesi[57].

I linfociti T, stimolati dalle APC, producono una varietà di citochine, tra cui l'INF- γ , ed iniziano ad uccidere le cellule infettate, tra cui le APC e i macrofagi, attraverso la via di perforina, che però, in questi animali, risulta alterata. L'alterazione della citotossicità dei linfociti T CD8+ comporta la persistenza di cellule infettate dal patogeno e quindi la continua esposizione degli antigeni da parte delle APC con conseguente proliferazione degli stessi linfociti T e dei macrofagi [58].

Lo sviluppo di topi *knockout* per perforina ha permesso anche di sottolinearne il ruolo critico anche nella soppressione dei tumori. Questi modelli animali sono più suscettibili alla tumorigenesi e per questo sviluppano spontaneamente linfomi in età adulta. Perforina sembra contribuire alla soppressione del linfoma quando viene compromessa l'espressione di p53 [52].

Perforina e le malattie nell'uomo.

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

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

Le manifestazioni cliniche e biologiche dipendono da un'incontrollata attivazione di linfociti T, che promuovono la conseguente attivazione di macrofagi e la produzione di citochine. Nei pazienti con HPS in fase attiva, i livelli serici di citochine Th1, tra cui IFN- γ , IL-12 e IL-18 [59-60], sono significativamente più elevati rispetto ai pazienti in remissione o ai controlli sani. IL-18 sembra giocare un ruolo importante nell'induzione della secrezione di IFN- γ e IL-12, i cui livelli correlano positivamente con il progredire della malattia. Anche i livelli di citochine pro-infiammatorie, TNF α , IL-1 β e IL-6, risultano essere elevati nei pazienti con HPS rispetto ai controlli, mentre non c'è alcuna differenza nella secrezione di IL-4 [60-61].

La FHL è una malattia autosomica recessiva che colpisce circa 1/50000 nati. E' una patologia caratterizzata da massiva attivazione macrofagica (definita anche linfoistocitosi), che insorge di solito dopo un periodo di buona salute e che dura da alcuni mesi ad alcuni anni dopo la nascita [62]. 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.

Inoltre, l'attività citotossica dei CTL e delle cellule NK è severamente ridotta. Si assiste a risposte immunitarie incontrollate che comportano infiltrazione e distruzione di tessuti ad opera dei macrofagi attivati (CD68+), e dei CTL CD8+. Queste cellule sono spesso presenti nel midollo osseo, nella milza, nei linfonodi, nel fegato e nel sistema nervoso centrale. Anche altri organi possono essere infiltrati da queste cellule: i polmoni, il cuore, l'intestino, il timo, i reni e il pancreas. L'attivazione incontrollata dei macrofagi e dei linfociti T comporta il rilascio di citochine pro-infiammatorie che contribuiscono alla emofagocitosi, all'infiltrazione cellulare e al danno d'organo. Il livello di caspasi spontaneamente attivate nei linfociti di pazienti FHL è ridotto, e questo può contribuire a spiegare l'elevato numero di linfociti T attivati [63].

Diversi studi hanno dimostrato che FHL è legata a tre loci genici: 9q21-22 [FHL1] [64]. (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 [65] e mutazioni in *Munc* 13-4 portano a FHL3 [66].

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

I genitori dei pazienti mutati in perforina, che sono portatori asintomatici ed eterozigoti per la mutazione, hanno spesso ridotti livelli di perforina nelle cellule NK e nei CTL [67] ed in alcuni casi mostrano una ridotta attività litica delle NK.

Nei pazienti FHL sono state individuate una varietà di mutazioni lungo tutta la sequenza codificante per perforina, mutazioni che includono codoni di stop, delezioni e sostituzioni aminoacidiche ([65,68-69-70]. Alcune mutazioni in perforina sembrano prerogativa di una data etnia che suggerisce la presenza di un allele ancestrale comune.

Infine, mutazioni nella sequenza codificante di perforina sono responsabili di circa il 60% dei casi di FHL nelle popolazioni giapponese [71] e di quasi il 58% nella popolazione nord-americana [69].

Recentemente, variazioni del gene di perforina sono state associate allo sviluppo della sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS) [72], dell'anemia aplastica [73] e del linfoma anaplastico a grandi cellule [74].

Perforina e la Sclerosi Multipla.

Perforina risulta essere espressa costitutivamente negli astrociti, una volta attivati, in seguito all'innescio del processo infiammatorio. Gli astrociti esprimono anche il ligando di Fas (FasL) come meccanismo difensivo nei confronti di linfociti T autoreattivi che infiltrano il tessuto nervoso [75]. Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che gli oligodendrociti, deputati alla sintesi della mielina, sono suscettibili alla lisi osmotica indotta da perforina [76].

La demielinizzazione è stata inizialmente considerata come la causa primaria del deficit neurologico, alla base della sclerosi multipla. Diverse osservazioni hanno poi suggerito che non è sufficiente, da sola, a causare un deficit neurologico permanente. Il difetto neurologico associato alla demielinizzazione è il risultato della lesione assonale mediata dalle cellule effettrici, come i linfociti T citotossici. Howe et al ipotizzano che il danno assonale secondario alla demielinizzazione è mediato da agenti infiammatori ed uno di questi è perforina. Tale osservazione potrebbe avere interessanti implicazioni terapeutiche, ad esempio si potrebbe, in futuro, proteggere gli assoni demielinizzati manipolando perforina [77].

SCOPO DEL LAVORO

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria e demielinizzante del sistema nervoso centrale (SNC), mediata da una risposta autoimmune dei linfociti T helper proinfiammatori (TH1) e dei linfociti T citotossici (CTL) contro antigeni della guaina mielinica.

L'evento scatenante la malattia non è noto, ma studi epidemiologici suggeriscono che è probabilmente innescata da fattori ambientali, quali le infezioni virali, ed è inoltre favorita da un "background" genetico predisponente. Infatti, diversi geni sono coinvolti nella suscettibilità alla malattia ed alcuni di questi (antagonisti IL-1beta, IL-1R e osteopontina) svolgono un ruolo importante nella risposta immunitaria. Nel nostro laboratorio abbiamo descritto alcuni alleli del gene della citochina osteopontina (OPN) capaci di favorire lo sviluppo della sclerosi multipla, e variazioni monoalleliche del gene di perforina (A91V e N252S) agiscono da fattore predisponente per lo sviluppo della sindrome autoimmune/linfoproliferativa (ALPS), una rara malattia autoimmune ereditaria causata da alterazioni dell'apoptosi linfocitaria. Inoltre, la variazione A91V avrebbe un effetto cooperativo con gli alleli di osteopontina, incrementando il rischio di sviluppare l'ALPS di 17 volte.

Con queste premesse, questo lavoro estende l'analisi del gene di perforina in una ampia casistica di pazienti con sclerosi multipla e ne valuta il suo ruolo ed una eventuale cooperazione con OPN nello sviluppo della malattia.

MATERIALI E METODI

Pazienti.

Nel nostro studio abbiamo analizzato il DNA genomico di due popolazioni indipendenti del Nord e del Centro-Sud Italia di pazienti con Sclerosi Multipla (391 maschi, 765 femmine; M/F:1/1.96) e di 1788 controlli sani e non imparentati tra loro. La prima popolazione (Nord Italia) era composta da 830 pazienti e 1341 controlli, la seconda (Centro-Sud Italia) da 326 pazienti e 447 controlli.

La diagnosi di sclerosi multipla e' stata effettuata seguendo i criteri di McDonald et al [78].

I pazienti sono stati arruolati dal centro Sclerosi Multipla dell'Università del Piemonte Orientale di Novara, dall'ospedale policlinico IRCCS di Milano, dall'istituto "Don Gnocchi" (Milano), dall'ospedale Santa Croce di Cuneo, Dipartimento di Neurologia dell'Università La Sapienza di Roma, e dal Dipartimento di Neurologia di Bari.

Tutti i pazienti e i controlli non sono imparentati tra loro, sono caucasici e italiani.

La fase clinica dello stato di malattia e' stato valutato come segue [79]:

RR: forma caratterizzata da fasi di recidive con successive totali remissioni, con parziali e residui deficit post recidiva e mancanza di progressione tra le recidive (n= 852);

PP: forma caratterizzata da progressione a partire dall'esordio della malattia con occasionali fasi di plateau(n=92);

SP: forma caratterizzata da un esordio RR seguito da progressione con o senza occasionali recidive , minori remissioni e plateau (n=212).

Tutti i pazienti hanno fornito il loro consenso informato in accordo con la dichiarazione di Helsinki (International Committee of Medical Journal Editors, 1995) [80]. La ricerca e' stata approvata dalla commissione etica di Novara.

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).

PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

L’esone 2 e 3, codificanti il gene perforina, includendo anche le giunzioni esone-introne, sono stati amplificati da campioni di DNA genomico estratto da PBMC dei pazienti e controlli e usando i seguenti primers, per l’esone 2: 5’-CCCTTCCATGTGCCCTGATAATC-3’ (*forward*) e 5-AAGCAGCCTCCAAGTTTGATTG-3’ (*reverse*) e per l’esone 3: 5’-CCAGTCCTAGTTCTGCCCACTTAC-3’ (*forward*) e 5’-GAACCCCTTCAGTCCAAGCATAAC-3’ (*reverse*). La reazione di PCR è stata allestita con 100-300 ng di DNA in volume finale di 50µl contenente il tampone di reazione (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0.5 µM di ciascun oligonucleotide, 0.2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi e 1U Taq DNA polimerasi (5U/µl) (Invitrogen). Le concentrazioni di MgCl₂ impiegate per l’amplificazione sono: 1mM (esone 2) e 2 mM (esone 3).

Le condizioni di reazione sono le seguenti:

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

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

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

una di appaiamento a 63°C per 30'', e una di sintesi a 72°C per 30'. Segue infine un ciclo di sintesi a 72°C per 7'.

Saggio TaqMan.

Nella seconda popolazione di pazienti SM e di controlli, la genotipizzazione della variazione A91V è stata effettuata mediante l'utilizzo del saggio di discriminazione allelica TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). I primers allele-specifici e le relative sonde impiegati per la discriminazione dello SNP + 272 C/T (A91V) sono stati precedentemente riportati in letteratura [81]. Il genotipo di ciascun campione è stato determinato usando il software SDS 1,3 per discriminazione allelica.

Elettroforesi su gel d'agarosio.

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

Sequenziamento automatico.

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

Le reazioni di sequenziamento sono quindi state allestite servendosi del kit specifico ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v1.1 (Applied Biosistem), dotati di dideossinucleotidi ciascuno legato ad un fluorocromo differente. Seguendo il protocollo consigliato dalla ditta, per un volume finale di reazione di 10 µl, sono stati addizionati al DNA purificato, 2 µl di BigDye Sequencing Buffer (in dotazione con il kit) e 1 µl primer (3,2 µM/µl). La reazione di sequenziamento prevede l'utilizzo del seguente programma: un ciclo di denaturazione a 96° C per 1

minuto, seguito da 25 successivi cicli composti da una fase di denaturazione a 96°C per 10'', una di appaiamento a 50°C per 5'', e una di sintesi a 60°C per 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 µl del purificato sono stati addizionati a 10 µl di formammide e denaturati (3' a 95°C), quindi caricati su piastra ottica per la successiva analisi al sequenziatore.

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

Forward: 5'- CAGGTCAACATAGGCATCCACG -3'

Reverse: 5'- GAACAGCAGGTCGTTAATGGAG -3'

Per il sequenziamento del gene di osteopontina sono stati impiegati gli stessi primers usati nella reazione di amplificazione.

PCR allele-specifica.

L'allele *wild type* (91A) e l'allele mutante (91V) sono stati amplificati separatamente mediante amplificazione per PCR del DNA genomico (*forward* 91A 5'-CTCCCAGCGCCTGCCTCCGGC-3'; *forward* 91V 5' CTCCCAGCGCCTGCCTCCGGC-3'; *reverse* 5'-GTATGCTTGGACTGAAGGGGTTC-3). I prodotti di PCR , una volta purificati con il kit EXO/SA, sono stati tipizzati per la variazione R357W mediante sequenziamento con specifico ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v1.1 (Applied Biosistem), usando un primer interno, la cui sequenza è qui di seguito riportata: *forward* 5'-CAGGTCAACATAGGCATCCACG-3'.

Espressione di perforina mediante citofluorimetria.

L'espressione di perforina nelle cellule citotossiche è stata valutata mediante citofluorimetria sui PBMCs isolati da sangue eparinato. I PBMC sono stati prima incubati per 30 min a 4°C in PBS1X con gli anticorpi diretti contro gli antigeni di membrana. In seguito le cellule sono state fissate e permeabilizzate mediante l'impiego del kit "Fix & Perm cell permeabilization"(Caltag, Hamburg).

Le cellule sono state successivamente lavate 2 volte con PBS1X addizionato di BSA (0.5g/l) (bovine serum albumin) e 0.02% di sodio azide (Sigma-Aldrich corporation, St Louis, Missouri) ed incubate per 30 min a 4°C con anticorpo anti-perforina coniugato con FITC. Le cellule sono state poi analizzate al citofluorimetro (FACScan, Becton-Dickinson, San Jose, CA)

Saggio di citotossicità.

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

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

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

Analisi statistica.

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

RISULTATI

1-Ricerca della variazione A91V del gene di perforina nei pazienti con sclerosi multipla (SM).

La variazione nucleotidica C272T del gene di perforina (*PRF1*) cambia il codone 91-GCG, codificante per un'alanina, nel codone GTG che codifica per una valina (A91V). La suddetta numerazione è riferita al cDNA considerando l'adenina della tripletta di inizio ATG come +1 (accession number: M28393). Abbiamo ricercato tale sostituzione, mediante il sequenziamento dell'esone 2, in una prima casistica di 830 pazienti con sclerosi multipla e 1341 soggetti sani di controllo, per stabilire la frequenza del polimorfismo nella popolazione italiana. Pazienti e controlli sono caucasici e geograficamente originari del Nord Italia.

La variazione A91V è stata trovata in 111 pazienti con SM (in eterozigosi in 103 pazienti ed in omozigosi in 8) ed in 142 controlli (136 eterozigoti e 6 omozigoti). La frequenza allelica è risultata essere significativamente aumentata nei pazienti SM rispetto ai controlli (7.2 vs 5.5%, $P < 0,05$) conferendo un O.R=1.32 (95%CI:1.02-1.71) per lo sviluppo della sclerosi multipla **[tabella 1]**. La distribuzione genotipica di questa variazione è in equilibrio di Hardy-Weinberg in ciascun gruppo. Questi dati suggeriscono che l'A91V possa essere un fattore predisponente per lo sviluppo della malattia.

Abbiamo successivamente confermato questo risultato in una seconda popolazione di 326 pazienti e 447 controlli sani, mediante un saggio di discriminazione allelica TaqMan. In questo caso, tutti i soggetti sono originari del Centro-Sud Italia, dal momento che alcuni studi suggeriscono che la frequenza dell'A91V sia più alta nel Sud rispetto a quella riscontrata nel Nord Italia **[82]**. La variazione A91V è stata trovata in 53 pazienti con SM (in eterozigosi in 51 pazienti ed in omozigosi in 2) ed in 49 controlli (47 eterozigoti e 2 omozigoti). La frequenza allelica è risultata essere significativamente aumentata nei pazienti SM rispetto ai controlli (8.4 vs 5.7%, $P < 0,05$) conferendo un O.R=1.52 (95%CI:1.01-2.30) **[tabella 2]**. La distribuzione genotipica di questa variazione è in equilibrio di Hardy-Weinberg in ciascun gruppo.

Il fattore di rischio (OR) calcolato nelle due popolazioni (1156 pazienti e 1788 controlli) è risultato essere di 1.38 ((95%CI= 1.11-1.71)**[tabella 3]**.

Infine, non sono state riscontrate differenze nei soggetti portatori e/non della suddetta variazione in relazione alla forma clinica e/o decorso della malattia (RR, PP e SP).

2-Ricerca di variazioni nucleotidiche ex-novo nell'intera sequenza codificante di PRF1.

L'intera porzione codificante del gene di perforina è stata sequenziata in 134 pazienti MS e 383 controlli, ricercando variazioni nucleotidiche associate con la linfocitopenia fagocitaria familiare (FHL) o variazioni *ex novo*.

Abbiamo identificato, oltre all'A91V, tre variazioni missenso, in eterozigosi: A755G (in 1 paziente), G719A (2 pazienti) e C1069T (1 paziente). Tali variazioni determinano rispettivamente le seguenti sostituzioni aminoacidiche: N252S, R240H e R357W.

L'N252S è una variazione rara, precedentemente associata all'FHL e alla sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS); mentre le variazioni R240H e R357W non sono riportate in letteratura. Inoltre, il paziente con la mutazione R357W è portatore in eterozigosi anche della variazione A91V; tramite PCR allele specifica abbiamo dimostrato che le due variazioni sono state trovate su due alleli differenti (mutazioni bialleliche).

Sono state identificate altre due variazioni sinonime: la variazione G1428A (1 paziente) e la variazione A1620G (1 paziente). Le suddette variazioni non influenzano i siti di splicing. Nessuna delle nuove variazioni è stata riscontrata nei controlli.

Nel loro insieme, le variazioni precedentemente descritte, conferiscono un rischio di sviluppare la sclerosi multipla di tre volte (O.R=3.1 ;95%CI:1.61-5.95) **[tabella 4]**.

Al fine di valutare se la variazione R240H identificata nei 2 pazienti (Pz.1 e Pz.2) alterasse l'attività delle cellule NK, è stato allestito un saggio di citotossicità mediante il test del rilascio di ⁵¹Cr.

È stata utilizzata la linea cellulare K562 come cellula bersaglio, in quanto sensibile alla citotossicità mediata dalle cellule NK stesse. I risultati hanno mostrato che a basse dosi di effettore/bersaglio l'attività NK è risultata difettiva in un paziente, mentre borderline nell'altro **[tabella 5]**.

Infine, per saggiare l'influenza della suddetta variazione sull'espressione della proteina abbiamo eseguito un'immunofluorescenza intracitoplasmatica con successiva analisi citofluorimetrica. L'espressione di perforina e la proporzione di cellule NK (CD3-CD56+ e CD3-CD16+) è risultata essere borderline in un solo paziente. **[tabella 5]**.

Non è stato possibile valutare una eventuale correlazione tra la variazione R375W e l'espressione di perforina e/o attività NK, poiché il campione non è stato reperibile per l'analisi.

3-Effetti sinergici delle variazioni dei geni di perforina e osteopontina nella predisposizione allo sviluppo della sclerosi multipla.

Abbiamo recentemente descritto che alcuni alleli del gene della citochina osteopontina (OPN) sono capaci di favorire lo sviluppo della sclerosi multipla [13]. Questi alleli che costituiscono gli aplotipi 282C-750T-1083A-1239C e 282C-750T-1083G-1239C (denominati OPN^{high}) inducono la produzione di elevate quantità di OPN, la quale favorisce la risposta infiammatoria . Inoltre, abbiamo recentemente dimostrato che la variazione A91V e gli alleli OPN^{high} potessero avere un effetto di cooperatività nello sviluppo dell'ALPS [72].

Per determinare se tale cooperazione potesse esistere anche nella suscettibilità allo sviluppo della sclerosi multipla, il gene di osteopontina è stato sequenziato in 293 pazienti SM e in 377 controlli (della prima popolazione) ed è stata stabilita la frequenza della co-presenza dei genotipi di *PRF1* e OPN .

Questa analisi ha dimostrato che la co-presenza di A91V e degli alleli OPN^{high} conferisce un rischio di sviluppare la SM di circa 2 volte superiore relativamente all'assenza di entrambi i fattori di suscettibilità (O.R=2.07, 95%CI:1.05-4.10; p=0,035) [tabella 6].

Popolazione 1 (Nord Italia)		
ALLELI A91V	SM N (%)	CONTROLLI N (%)
A	1541 (92.8)	2534 (94.5)
V	119 (7.2)	148 (5.5)
statistica	‡OR= 1.32 (95%CI:1.02-1.71 p=0.032)	
GENOTIPI		
AA	719 (86,63)	1199 (89,41)
AV	103 (12,4)	136 (10.14)
VV	8 (0,97)	6 (0,45)

Tabella 1. Distribuzione della frequenza della variazione A91V nella prima popolazione di pazienti SM (Nord Italia) e nei corrispettivi controlli. ‡:Odds ratio (OR) e 95% intervallo di confidenza (95% CI); χ^2 test calcolato sulle frequenze alleliche (N= numero di soggetti).

Popolazione 2 (Centro-Sud Italia)		
ALLELI A91V	SM N (%)	CONTROLLI N (%)
A	597(91.57)	843 (94.3)
V	55 (8.43)	51 (5.7)
statistica	‡OR= 1.52 (95%CI:1.01-2.30 p=0.045)	
GENOTIPI		
AA	273 (83.74)	398 (83.4)
AV	51 (15.64)	47 (10.5)
VV	2 (0,62)	2 (0,5)

Tabella 2. Distribuzione della frequenza della variazione A91V nella secondapopolazione di pazienti SM(Centro-sud Italia) e nei corrispettivi controlli. ‡:Odds ratio (OR) e 95% intervallo di confidenza (95% CI); χ^2 test calcolato sulle frequenze alleliche (N= numero di soggetti).

Popolazione TOTALE		
ALLELI A91V	SM N (%)	CONTROLLI N (%)
A	2138(92.5)	3377 (94.5)
V	174 (7.5)	199 (5.5)
statistica	‡OR= 138 (95%CI:1.11-1.71 p=0.0030)	
GENOTIPI		
AA	992 (85.8)	1597 (89.3)
AV	154 (13.34)	183 (10.3)
VV	10 (0,86)	8 (0,4)

Tabella 3. Distribuzione della frequenza della variazione A91V nella popolazione TOTALE di pazienti SM e nei corrispettivi controlli. ‡:Odds ratio (OR) e 95% intervallo di confidenza (95% CI); χ^2 test calcolato sulle frequenze alleliche (N= numero di soggetti).

Variazione nucleotidica	Sostituzione aminoacidica predetta	letteratura	SM* (n=134)	Controlli (n=383)
C272T	A91V	Associata FHL	17	23
A755G	N252S	Associata FHL	1	1
G719A	R240H	nuova	2	0
C1069T	R357W	nuova	1	0
G1428A	nessuna(G476G)	nuova	1	0
A1620G	nessuna(Q540Q)	nuova	1	0
Statistica[‡]			OR= 3.10 95%CI: 1.61-5.95 p=0.0003153	

Tabella 4. Variazioni nucleotidiche del gene di perforina identificate in 134 pazienti SM* e 383 controlli. La suddetta numerazione è riferita al cDNA considerando l'adenina della tripletta di inizio ATG come +1 (accession number: M28393). ‡:Odds ratio (OR) e 95% intervallo di confidenza (95% CI); χ^2 test calcolato sulle frequenze alleliche.

Variazione nucleotidica	*SM	Attività NK (effettore/target ratio)			Espressione perforina‡		%cellule NK	
		100:1	30:1	10:1	%	MFI-R	CD3 ⁻ CD16 ⁺	CD3 ⁻ CD56 ⁺
R240H	Pz.1	16	6 [§]	2 [§]	20	16	15	15
R240H	Pz.2	30	12	5	14 [§]	7	6	9
nessuno	Controlli (n=13)	40 (15-66)	26 (8-50)	14 (4-31)	23 (17-26)	9 (5-20)	11 (5-31)	17 (4-27)

Tabella 5. Attività NK, espressione di perforina e proporzione di NK nei PBMC dei due pazienti *SM portatori della variazione R240H. L'attività delle cellule NK del paziente ALPS-11 è espressa come percentuale di lisi specifica di cellule K562 (target), quando incubate con le cellule effettrici (E) in differenti rapporti (100:1, 30:1, 10:1). L'espressione di perforina‡ è mostrata come proporzione di cellule positive (%) e valutazione delle intensità di fluorescenza (MFI).

Genotipi di suscettibilità	SM*		CONTROLLI	
	N‡	(%)	N	(%)
0	104	(35.5)	172	(45.6)
1 ^a (PRF1)	16	(5.46)	22	(5.8)
1 ^b (OPN)	148	(50.5)	163	(43.3)
2 (PRF1+OPN)	25	(8.54)	20	(5.3)
‡OR (95% CI)	2vs.0: 2.07 (1.05-4.10); p=0.0353944			

Tabella 6 Frequenza della distribuzione dei genotipi di suscettibilità di PRF1 (1^a) e OPN (1^b) nei pazienti SM* e nei controlli. (N‡ numero dei soggetti). ‡:Odds ratio (OR) e 95% intervallo di confidenza (95% CI).

DISCUSSIONE

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria e demielinizzante del sistema nervoso centrale (SNC), mediata da una risposta autoimmune dei linfociti T helper proinfiammatori (TH1) e dei linfociti T citotossici (CTL) contro antigeni della guaina mielinica.

L'evento scatenante la malattia non è noto, ma studi epidemiologici suggeriscono che è probabilmente innescata da fattori ambientali, quali le infezioni virali, ed è inoltre favorita da un "background" genetico predisponente.

Diversi geni sono coinvolti nella suscettibilità alla malattia ed alcuni di questi (antagonisti IL-1beta, IL-1R e osteopontina) svolgono un ruolo importante nella risposta immunitaria [83].

Il progetto qui presentato mostra il coinvolgimento del gene di perforina (*PRFI*) nella suscettibilità allo sviluppo della sclerosi multipla.

Perforina è una proteina presente nei granuli dei CTL e delle cellule NK ed è coinvolta nella citotossicità cellulo-mediata. Mutazioni bialleliche del gene di perforina (*PRFI*) causano la linfoistiocitosi emofagocitica familiare, una rara immunodeficienza congenita. Recentemente abbiamo descritto che variazioni monoalleliche di *PRFI* (A91V e N252S) possono agire da fattori predisponenti per lo sviluppo della sindrome autoimmune/linfoproliferativa (ALPS), una rara malattia autoimmune ereditaria causata da alterazioni dell'apoptosi linfocitaria. [72].

La variazione A91V è risultata essere più frequente nelle due popolazioni di pazienti SM analizzate rispetto ai corrispettivi controlli, incrementando il rischio di sviluppare la malattia di 1.3 volte nella prima popolazione e di 1.5 volte nella seconda. Il fattore di rischio (OR) calcolato, considerando un'unica popolazione (1156 pazienti e 1788 controlli) è risultato essere di 1.38 ((95%CI= 1.11-1.71). Questi dati sono in accordo con quelli da noi precedentemente descritti, dove la variazione A91V incrementava il rischio di sviluppare ALPS di un fattore di circa tre volte [72]. Invece, non abbiamo riscontrato alcuna associazione con la variazione N252S, che incrementa il rischio di sviluppare ALPS di 62 volte, dal momento che la sua frequenza è risultata essere simile sia nei pazienti che nella popolazione di controllo.

Diverse evidenze hanno mostrato che l'A91V è associata a malattie del sistema immunitario, come ad esempio il linfoma, la leucemia anaplastica a grandi cellule e la FHL nella forma atipica [73-74]. Inoltre, tale variazione riduce l'attività funzionale di perforina alterando la sua conformazione, diminuendo la sua attivazione proteolitica ed infine aumentandone la degradazione [84].

Risma et al hanno classificato l'A91V non come polimorfismo bensì come mutazione missenso di classe I, con un limitato impatto funzionale, che determina una parziale maturazione della proteina [85]. Voskoboinik et al. hanno recentemente dimostrato che tale variazione riduce i livelli di

espressione di perforina nelle cellule effettrici (“difetto pre-sinaptico”) e la sua capacità litica sulle cellule target, mostrando inoltre un effetto dominante negativo sulla proteina *wild type* (“difetto post-sinaptico”) [86].

Abbiamo sequenziato l’intera porzione codificante del gene di perforina in 134 pazienti MS e 383 controlli, ricercando variazioni nucleotidiche già precedentemente associate con la linfoistocitosi fagocita familiare (FHL) o variazioni *ex novo*. Sono state identificate due nuove mutazioni missenso nei pazienti SM che determinano le sostituzioni aminoacidiche R240H e R357W. Tali variazioni cadono nello stesso dominio della N252S in una regione di perforina detta MAC (Membrane-Attack Complex), che sembra essere critica per la formazione di pori nella membrana della cellula bersaglio [48]. L’analisi della attività delle cellule NK e dell’espressione di perforina nei due soggetti portatori delle nuove variazioni, non ha mostrato comunque un’importante riduzione. Dal momento che nei due pazienti la mutazione identificata era in eterozigosi, è ipotizzabile che l’R240H determini un leggero effetto sulla funzione di perforina senza esercitare un effetto dominante negativo sulla forma *wild-type*. Questo sarebbe in accordo con quanto già descritto della mutazione N252S, associata all’ALPS e alla FHL, ma con una rilevanza funzionale, a lungo dibattuta. Non è stato possibile valutare una eventuale correlazione tra la variazione R375W e l’espressione di perforina e/o attività NK, poiché il campione non è stato reperibile per l’analisi.

Infine, il paziente con la mutazione R357W è portatore in eterozigosi anche della variazione A91V (eterozigote composto); e le 2 due variazioni, situate su due alleli differenti (mutazioni bialleliche, possono aver contribuito allo sviluppo della sua malattia.

Abbiamo identificato in due pazienti SM e in nessun controllo due nuove variazioni che non determinano un cambiamento aminoacidico (G1428A e A1620G) e non alterano i siti di splicing. Ipotizziamo che possano teoricamente influenzare l’espressione della proteina direttamente o attraverso *linkage disequilibrium* con altre variazioni presenti nella regione 5’UTR. Comunque, non abbiamo potuto testare un loro effetto sull’espressione di perforina, perché non è stato possibile recuperare i corrispettivi campioni su cui effettuare tale analisi.

Le nuove mutazioni da noi identificate sono rare e non è pertanto possibile concludere che vi sia una loro individuale associazione alla malattia. Comunque, la loro presenza solo nei pazienti suggerisce che vi sia un effetto globale e maggiore sulla suscettibilità a sviluppare la malattia, rispetto alla sola A91V.

In linea con questa possibilità, nel loro insieme le variazioni precedentemente descritte conferiscono un rischio di sviluppare la sclerosi multipla di tre volte (O.R=3.1 95%CI:1.61-5.95).

Abbiamo recentemente dimostrato che la variazione A91V e gli alleli OPN^{high} potessero avere un effetto di cooperatività nello sviluppo dell’ALPS [72]. Per determinare se tale

cooperazione potesse esistere anche nella suscettibilità allo sviluppo della sclerosi multipla, il gene di osteopontina è stato sequenziato in 293 pazienti con SM e in 377 controlli (della prima popolazione) ed è stata stabilita la frequenza della co-presenza dei genotipi di PRF1 e OPN .

Questa analisi ha dimostrato che la co-presenza di A91V e degli alleli OPN^{high} conferisce un rischio di sviluppare la SM di circa 2 volte superiore relativamente all'assenza di entrambi i fattori di suscettibilità. Questo risultato non è sorprendente in quanto questi alleli determinano un incremento dei livelli di osteopontina e l'inibizione della morte cellulare indotta dall'attivazione dei linfociti (AICD), meccanismo implicato nello spegnimento della risposta immunitaria. [87]. Inoltre, diversi lavori hanno mostrato che OPN è espressa nelle placche sclerotiche e nella corda spinale di ratti affetti da encefalomielite sperimentale autoimmune (EAE) [88].

La citotossicità perforina-mediata è associata alla *clearance* delle cellule infettate da virus. È ipotizzabile che difetti della attività di perforina possano favorire lo sviluppo della malattia riducendo la *clearance* virale, attraverso una reazione crociata con antigeni *self* (meccanismo di mimetismo molecolare). In questo contesto è noto che le infezioni con il virus EBV (Epstein Barr virus) sono coinvolte nella patogenesi della FHL; ed è stato suggerito che possano rivestire un ruolo chiave come fattori scatenanti la sclerosi multipla [89].

Diverse evidenze mostrano che perforina e la citotossicità cellulo mediata sono anche coinvolti nello spegnimento della risposta immunitaria. I linfociti CTL e le cellule NK possono anche funzionare da regolatori negativi ed attraverso perforina possono indurre la morte cellulare dei linfociti effettori e delle cellule presentanti l'antigene (APC). Tali evidenze suggeriscono che una possibilità alternativa potrebbe essere che la predisposizione alla sclerosi multipla dipenda da alterazioni del sistema di immunoregolazione.

Infine, nella maggior parte de pazienti con SM sono presenti difetti ereditari della funzionalità di *Fas*, un altro meccanismo implicato nello spegnimento della risposta immunitaria [90] È dunque ipotizzabile una sua cooperazione con le variazioni di OPN e *PRF1*; a questo proposito, saranno condotti ulteriori studi volti a caratterizzarla.

BIBLIOGRAFIA

1. Ebers GC, Sadovnick AD, and Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. *Nature* 1995; 377:50-1,1995.
2. Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood H, Thorpe JW, Miller DH, Compston DA. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology* 1994;44:11-5.
3. Bell JI, Lathrop GM. Multiple loci for multiple sclerosis. *Nat Genet* 1996; 13:377-8.
4. Ebers GC, Dyment DA. Genetics of multiple sclerosis. *Semin Neurol* 1998;18:295-9.
5. Seboun E, Robinson MA, Doolittle TH, Ciulla TA, Kindt TJ, Hauser SL. A susceptibility locus for multiple sclerosis is linked to the T cell receptor beta chain complex. *Cell* 1989;57:1095-100.
6. Tienari PJ, Wikstrom J, Sajantila A, Palo J, Peltonen L. Genetic susceptibility to multiple sclerosis linked to myelin basic protein gene. *Lancet* 1992; 340:987-91.
7. Almeras L, Meresse B, Seze JD, Lefranc D, Dubucquoi S, Fajardy I, Vermersch P, Prin L. Interleukin-10 promoter polymorphism in multiple sclerosis: association with disease progression. *Eur Cytokine Netw* 2002; 13:200-6.
8. Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Sasaki H, Tashiro K. Genetic polymorphisms of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist in association with multiple sclerosis in Japanese patients. *J Neuroimmunol* 2001; 118:295-9.
9. Schmidt S, Barcellos LF, DeSombre K, Rimmler JB, Lincoln RR, Bucher P. Association of polymorphisms in the apolipoprotein E region with susceptibility to and progression of multiple sclerosis. *Am J Hum. Genet* 2002; 70: 708-717.
10. Almeras L, Meresse B, Seze JD, Lefranc D. et al. Interleukin-10 promoter polymorphism in multiple sclerosis: association with disease progression. *Eur Cytokine Netw* 2002; 13:200-6.

- 11.** Kuhlmann T, Glas M, zum Bruch C, Mueller W, Weber A, Zipp F, Bruck W. Investigation of bax, bcl-2, bcl-x and p53 gene polymorphisms in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2002; 129:154.
- 12.** Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, Sobel RA, Lock C, Karpuj M, Pedotti R, Heller R, Oksenberg JR, Steinman L. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 2001; 294:1731-5.
- 13.** Chiocchetti A, Comi C, Indelicato M, et al. Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *J Neuroimmunol* 2005;63: 172-178.
- 14.** Castelli L, Comi C, Chiocchetti A et al. ICOS gene haplotypes correlate with IL 10 secretion and multiple sclerosis evolution. *J Neuroimm* 2007;186:193-8.
- 15.** Johnson, RT. The Virology of Demyelinating Diseases. *Ann Neurol*1994; 36:S54-D60.
- 16.** Haahr S, Munch M, Christensen T, Meller-Larson A, Hvas J. Cluster of multiple sclerosis patients from Danish Community. *Lancet* 1997; 349:9056.
- 17.** Jacobson S, Flerlage ML, and McFarland HF. Impaired measles virus-specific cytotoxic T cell response in multiple sclerosis. *J Exp Med* 1985; 162:839-50.
- 18.** Dean G, and Kurtzke JF. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med* 1971;3: 725-9.
- 19.** Alter M, Leibowitz U, and Speer J. Risk of multiple sclerosis related to age at immigration to Israel. *Arch. Neurol* 1966; 15: 234-7.
- 20.** Kurtzke JF. MS epidemiology worldwide. One view of current status. *Acta. Neurol. Scand.* Suppl 1995; 161:23-33.
- 21.** Kurtzke JF. The Epidemiology of Multiple Sclerosis. In "Multiple Sclerosis: Clinical and pathogenetic basis" (Cedric D. Raine, Ed.) 91-139 Chapman and Hall, London,1997.

- 22.** Henson TE, Brody JA, Sever JL, Dyken ML, and Cannon J. Measles antibody titers in multiple sclerosis patients, siblings, and controls. *JAMA* 1970; 211:1985-9.
- 23.** Alperovitch A, Berr C, Cambon-Thomsen A, Puel J, Dugoujon JM, Ruidavets JB, and Clanet M. Viral antibody titers, immunogenetic markers, and their interrelations in multiple sclerosis patients and controls. *Hum Immunol* 1991; 31:94-9.
- 24.** Sriram S, Stratton CW, Yao S, Tharp A, Ding L, Bannan JD, Mitchell WM. Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann. Neurol* 1999; 46: 6-14.
- 25.** Yao SY, Stratton CW, Mitchell WM, Sriram S. CSF oligoclonal bands in MS include antibodies against Chlamydia antigens. *Neurology* 2001; 56:1168-76.
- 26.** Jahnke U, Fischer EH, and Alvord EC. Sequence homology between certain viral proteins and proteins related to encephalomyelitis and neuritis. *Science* 1985; 229:282.
- 27.** Jacobson S. Association of human herpesvirus-6 and multiple sclerosis: here we go again? *J. Neurovirol* 1998; 4: 471-473.
- 28.** Lassmann H. Mechanisms of demyelination and tissue destruction in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2002;104:168-71.
- 29.** Cannella B, Raine C. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 1995;37:424-35.
- 30.** Hauser SL, Fleischnick E, Weiner HL, Marcus D, Awdeh Z, Yunis EJ, Alper CA. Extended major histocompatibility complex haplotypes in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1989;39:275-7.
- 31.** Burmham, J.A., Wright, R.R., Dreisbach, J. and Murray, R.S. The effect of high-dose steroids on MRI gadolinium enhancement in acute demyelinating lesions. *Neurology* 1991; 41:1349-54.

- 32.** Stone, L.A., Frank, J.A., Albert, P.S. Bash, C., Smith, M.E., Maloni, H., and McFarland, H.F. The effect of interferon- β on blood-brain-barrier disruptions demonstrated by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann. Neurol* 1995; 37:611-9.
- 33.** Tourtellotte, W.W. The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis In *Handbook of Clinical Neurology 3 (revised series), Demyelinating Diseases* (eds P.J. Vinken, G.W. Bruyn, H.L. Klawans and J.C. Koetsier) 79-130, Amsterdam/New York, Elsevier, 1985.
- 34.** Swanborg RH. Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;77:4-13.
- 35.** Fritz RB, and McFarlin DE. Encephalitogenic epitopes of myelin basic protein, In “Antigenic Determinants and Immune Response” (ed. E.E. Sercarz) *Chem. Immunol.* 46, Basle, Karger. pp 101-25, 1989.
- 36.** Flugel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, Ellwart JW, Willem M, Lassmann H, Wekerle H. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 2001;14:547-60.
- 37.** Owens T, Wekerle H, Antel J. Genetic models for CNS inflammation. *Nat Med* 2001;7:161-6.
- 38.** Steinman L. Some misconceptions about understanding autoimmunity through experiments with knockouts. *J Exp Med* 1997; 185:2039-41.
- 39.** Hohlfeld R, Wiendl H. The ups and downs of multiple sclerosis therapeutics. *Ann Neuro* 2001; 49:281-4.
- 40.** Martin R, Sturzebecher CS, McFarland HF. Immunotherapy of multiple sclerosis: where are we? Where should we go? *Nat Immunol* 2001; 2:785-8.
- 41.** Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 1996; 85:299-302.

- 42.** Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Schindler, J. and Johnson, K.P. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 1987;37:1097-102.
- 43.** Weiner H. Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell mediated autoimmune disease. *Arch.Neurol.* 2004;61: 1613-1615.
- 44.** Bar-Or A, Oliveira EM, Anderson DE, Hafler DA. Molecular pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1999; 100:252-9.
- 45.** Lassman H, and Ranshoff RM: The CD4-Th1 model for multiple sclerosis. A critical (correction of crucial) re-appraisal. *Trends Immun* 2004; 25:132-137.
- 46.** Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, et al. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 2000;123:1174-83.
- 47.** Johnson AJ, Suidan GJ, McDole J and Pirko I. The CD8 cell in multiple sclerosis: suppressor or mediator of neuropathology? *Intern Rev of Neurol* 2007; 79:73-97.
- 48.** Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2006;6:940-52.
- 49.** Nalefski EA, Falke JJ. The C2 domain calcium binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci* 1996; 5:2375-2390.
- 50.** 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* 1997;16:7287-7296.
- 51.** Trapani J.A, Sutton V.R. Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Curr.Opin.Immunol* 2003; 15:533-43.

- 52.** Smyth M.J., Thia K.Y., Street S.E., MacGregor D., Godfrey D.I., Trapani J.A. Perforin mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 2000;192:755-760.
- 53.** 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* 2000;103: 491-500.
- 54.** 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* 2002; 196:493-503.
- 55.** Voskoboinik I, Thia MC, Fletcher J, Ciccone A, Browne K, Smith MJ, Trapani Ja. Calcium dependent plasma membrane and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: a critical role for aspartate residues 429, 435, 483 and 485, but not 491. *J Biol Chem* 2005;280:8426-8434.
- 56.** Kagi, D., Ledermann, B., Burkl, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K.J., Podack, E.R., Zinkernagel, R.M. & Hengartner, H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994; 369:31-37.
- 57.** Jordan, M.B., Hildeman, D., Kappler, J. and Marrack, P.: An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) CD8+ T cells and interferon gamma are essential for the disorder. *Blood* 2004;104:735-743.
- 58.** Moretta, L., Moretta, A., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. On the pathogenesis of perforin defects and related immunodeficiencies. *Immunology Today* 2000; 21:593-594.
- 59.** Osugi, Y., Hara, J and Tagawa, S. Cytokine production regulating Th1 and Th2 cytokines in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 1997; 89:4100-4103.
- 60.** Takada H., Nomura A., Ohga S., Hara T. Interleukin-18 in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Leuk Lymphoma* 2001; 42:21-28.

- 61.** 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* 1991; 85:93-99.
- 62.** 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* 2002; 100:2266-2267.
- 63.** Fadeel, B., Orrenius, S. & Henter, J.I. Induction of apoptosis and caspase activation in cells obtained from familial haemophagocytic lymphohistiocytosis patients. *Br J Haematol* 1999;106:406-415.
- 64.** 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* 1999; 64:165-171.
- 65.** 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* 1999;286: 1957-1959.
- 66.** 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* 2003; 115:461-473.
- 67.** Kogawa, K., Lee, S.M., Villanueva, J., Marmer, D., Sumegi, J. & Filipovich, A.H. Perforin expression in cytotoxic lymphocytes from patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis and their family members. *Blood* 2002; 99:61-66.
- 68.** Busiello, R., Adriani, M., Locatelli, F., Galgani, M., Fimiani, G., Clementi, R., Ursini, M.V., Racioppi, L. & Pignata, C. Atypical features of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 2004; 103: 4610-4612.

- 69.** 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* 2004;41: 137-144.
- 70.** Voskoboinik, I., Thia, M-C., De Bono, A., Browne, K., Cretney, E., Jackson, J.T., Darcy, P.K., Jane, S.M., Smyth, M.J. & Trapani, J.A. The functional basis for hemophagocytic lymphohistiocytosis in a patient with co-inherited missense mutations in the perforin (PFN1) gene. *J Exp Med* 2004; 200: 811-816.
- 71.** Suga, N., Takada, H., Nomura, A., Ohga, S., Ishii, E., Ihara, K., Ohshima, K. & Hara, T. Perforin defects of primary haemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Br J Hematol* 2002;116:346-349.
- 72.** Clementi R, Chiocchetti A, Cappellano G, et al. Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function. *Blood* 2006;108:3079-84.
- 73.** Solomu E, Gibellini F, Stewart B. Perforin gene mutations in patients with acquired aplastic anemia. *Blood* 2007; 109:5234-7.
- 74.** Cannella S, Santoro A, Bruno G. Germline mutations of the perforin gene are afrequent occurrence in childhood anaplastic large lymphoma. *Amer Cancer Soc* 2007; 2566-2570.
- 75.** Gasque P, Jones J, Singhrao SK, Morgan P. Identification of an Astrocyte Cell Population from Human Brain that Expresses Perforin; a Cytotoxic Protein Implicated in Immune Defence. *J Exp Med* 1998; 187: 451 – 460.
- 76.** Zeine R, Cammer W, Barbarese E, Liu CC, Raine CS. Structural dynamics of oligodendrocyte lysis by perforin in culture : relevance to multiple sclerosis. *The Journal of Neuroscience* 2001; 64 : 380 – 391.
- 77.** Howe C.L and Rodriguez, M. Remyelination as neuroprotection. In: *Multiple Sclerosis as a Neuronal Disease*. S.G. Waxman, Ed. Elsevier Academic Press, San Diego 2005: 389–419.

- 78.** McDonald WI, Compston A., Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50:121–127.
- 79.** Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology* 1996;48:907–911.
- 80.** International Committee of Medical Journal Editors, Protection of patients' rights to privacy. *Br Med J* 1995; 311:1272.
- 81.** Mehta PA, Davies SM, Kumar A, et al. Perforin polymorphism A91V and susceptibility to B-precursor childhood acute lymphoblastic leukaemia: a report from the Children's Oncology group. *Leukemia* 2006;20: 1539-41.
- 82.** Busiello R, Adriani M, Locatelli F, et al. Atypical features of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 2004;103:4610-4612.
- 83.** Giordano M, D'Alfonso S, Momigliano-Richiardi P. Genetics of multiple sclerosis: linkage and association studies. *Am J Pharmacogenomics* 2002; 2:37-58.
- 84.** Trambas C, Gallo F, Pende D, et al. A single amino acid change, A91V, leads to conformational changes that can impair processing to the active form of perforin. *Blood* 2005;106:932-937.
- 85.** Risma KA, Frayer RW, Filipovich AH, Sumegi J. Aberrant maturation of mutant perforin underlies the clinical diversity of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Clin Invest* 2006;116:182-192.
- 86.** Voskoboinik I, Sutton VR, Ciccone A, et al. Perforin activity and immune homeostasis: the common A91V polymorphism in perforin results in both pre- and post-synaptic defects in function. *Blood* 2007; 110:1184-90.
- 87.** Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, et al. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 2001; 294:1731-1735.

- 88.** Jansson M, Panoutsakopoulou V, Baker J, et al. Cutting edge: Attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in eta-1/osteopontin-deficient mice. *J Immunol* 2002; 168:2096-2099.
- 89.** Lunemann JD, Munz C. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Curr Neurol* 2007;7:253-8.
- 90.** Comi C, Leone M, Bonisconi S, et al. Defective T cell fas function in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2000;55:921-7.

CORSI FREQUENTATI II anno:

Corso di Statistica. Docente: Prof. Magnani.

SEMINARI INTERNI AL DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

Anno Accademico 2006/07

GENE SILENCING BY RNA INTERFERENCE (RNAI)

10 GENNAIO 2007

Prof.ssa P. DeFilippi

DETECTION OF miRNA TARGET GENES THROUGH STATISTICAL
ANALYSIS OF DNA MOTIFS IN HUMAN-MOUSE 3'-UTR REGIONS

17 GENNAIO 2007

Prof. M. Caselle

PATOGENESI DEL DIABETE MELLITO DI TIPO 1: stiamo vincendo o stiamo perdendo?

18 GENNAIO 2007

Prof. G.F. Bottazzo

GENE THERAPY STRATEGIES FOR PHENYLKETONURIA

1 FEBBRAIO 2007

Prof. B. Thöny

FRAGILE X SYNDROME FROM RNA METABOLISM IMPAIRMENT TO SPINE
DYSMORPHOGENESIS

22 FEBBRAIO 2007

Prof. C. Bagni

VITA, OPERE E MIRACOLI DELL'EPATOCITA

9 FEBBRAIO 2007

Prof. M Tripodi

PROTEIN MICROARRAYS DEVELOPMENT OF NEW SUPPORTS FOR IMPROVED
SENSITIVITY

14 MARZO 2007

Dr. M. Cretich

COLANGIOPATIE AUTOIMMUNI

15 MARZO 2007

Prof. M. Podda

MICROARRAYS DI TESSUTI: UNA STRATEGIA PER IDENTIFICARE NUOVI
BIOMARCATORI TUMORALI

16 MARZO 2007

Dott.ssa M. Capra

DROSOPHILA AS A MODEL FOR AGING AND CANCER

16 MARZO 2007

Dott. Bohmann

MARCATORI FARMACOGENETICI NEL CARCINOMA COLORETTALE: QUALI
PROSPETTIVE PER UNA TERAPIA PERSONALIZZATA?

29 MARZO 2007

Prof. E. Mini

RELAZIONE TRA STRUTTURA E FUNZIONE DELLE PROTEINE MEDIANTE
ANALISI DEL PROTEIN DATA BASE

12 APRILE 2007

Prof. Milanesio

DIFETTI GENETICI DEL PRE-B CELL RECEPTOR

16 MAGGIO 2007

Prof. Ferrari

THE REGULATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS BY SMAD SIGNALING

25 MAGGIO 2007

Dott. Karlsson

TRANSLATING BASIC SCIENCE INTO THERAPEUTIC STRATEGIES FOR
SHWACHMANN DIAMOND SYNDROME

28 MAGGIO 2007

Dott. Ellis

SINDROMI AUTINFIAMMATORIE

4 GIUGNO 2007

Prof. A Martini

BIOINFORMATICS TOOLS FOR THE ANALYSES OF UTRs AND FOR THE
PRODICTION OF ALTERNATIVE SPLICE SITE

21 GIUGNO 2007

Prof. E Mignone

CONGRESSI FREQUENTATI:

16th European Congress of Immunology; **PARIS**, 6-9 September 2006 (**I ANNO**)

XIV TELETHON CONVENTION, PALAZZO DEI CONGRESSI, **SALSOMAGGIORE TERME** 12-14 MARZO
2007(**II ANNO**).

COMUNICAZIONI A CONGRESSI:

I ANNO DI DOTTORATO:

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. 16th European Congress of Immunology; PARIS, France 6-9- September 2006 (**PRESENTAZIONE POSTER**).

VARIAZIONI NEL GENE DI PERFORINA IN PAZIENTI CON SCLEROSI MULTIPLA.

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

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

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

II ANNO DI DOTTORATO:

XIV TELETHON CONVENTION, PALAZZO DEI CONGRESSI, SALSOMAGGIORE TERME 12-14 MARZO 2007.

SEARCH FOR GENETIC ALTERATION OF THE FAS SYSTEM IN THE AUTOIMMUNE/LYMPHOPROLIFERATIVE SYNDROME (ALPS). DIANZANI U., CHIOCCHETTI A., **CAPPELLANO G.**, ORILIERI E., CERUTTI E., FERRETTI E., CLEMENTI R., NOTARANGELO L., RAMENGGHI U. (**PRESENTAZIONE POSTER**)

PUBBLICAZIONI

Rita Clementi, Annalisa Chiocchetti, **Giuseppe Cappellano**, Elisa Cerutti, Massimo Ferretti, Elisabetta Orilieri, Irma Dianzani, Marina Ferrarini, Marco Bregni, Cesare Danesino, Valeria Bozzi, Maria Caterina Putti, Franco Cerutti, Angela Cometa, Franco Locatelli, Rita Maccario, Ugo Ramenghi, and Umberto Dianzani. **VARIATIONS OF THE PERFORIN GENE IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNITY/LYMPHOPROLIFERATION AND DEFECTIVE FAS FUNCTION.** Blood. 2006;108:3079-84.

Elisa Zavattaro, Barbara Azzimonti, Michele Mondini, Marco De Andrea, Cinzia Borgogna, Valentina Dell'Oste, Massimo Ferretti, Stefania Nicola, **Giuseppe Cappellano**, Adriana Carando, Giorgio Leigheb, Santo Landolfi, Umberto Dianzani and Marisa Gariglio. **IDENTIFICATION OF DEFECTIVE FAS FUNCTION AND VARIATION OF THE PERFORIN GENE IN AN**

EPIDERMODYSPLASIA VERRUCIFORMIS PATIENT LACKING EVER1 AND EVER2 MUTATIONS. Journal of Investigative dermatology (2007) in press