

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo
Avogadro”



Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare
Ciclo XXI

Relazione II° anno (2006-2007)

***Variazioni del gene di Perforina in pazienti con
Diabete di Tipo1 (T1D)***

Candidata: Elisabetta Orilieri

Tutor: Umberto Dianzani

INDICE

INTRODUZIONE	<i>pag. 3</i>
<i>1- DIABETE DI TIPO 1 (T1D)</i>	<i>pag. 3</i>
<i>2- PERFORINA</i>	<i>pag. 6</i>
<i>2.1- Deficit di perforina nell'uomo: la Linfoistocitosi Emofagocitica Familiare (FHL)</i>	<i>pag. 8</i>
SCOPO DEL LAVORO	<i>pag. 10</i>
MATERIALI E METODI	<i>pag. 11</i>
<i>1-PAZIENTI</i>	<i>pag. 11</i>
<i>2-ESTRAZIONE DI DNA DA SANGUE</i>	<i>pag. 11</i>
<i>3-MISURAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI ALLO SPETTROFOTOMETRO</i>	<i>pag. 12</i>
<i>4-PCR (Polymerase Chain Reaction)</i>	<i>pag. 12</i>
<i>5-ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO</i>	<i>pag. 13</i>
<i>6-SEQUENZIAMENTO AUTOMATICO</i>	<i>pag. 13</i>
<i>7-DISCRIMINAZIONE ALLELICA MEDIANTE TAQMAN 5'</i>	<i>pag. 14</i>
<i>8-SAGGIO DI CITOTOSSICITA'</i>	<i>pag. 14</i>
<i>9-VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI PERFORINA</i>	<i>pag. 15</i>
<i>10-ANALISI STATISTICA</i>	<i>pag. 15</i>
RISULTATI	<i>pag. 16</i>
<i>1-RICERCA DELLE VARIAZIONI N252S E A91V DI PERFORINA</i>	<i>pag. 16</i>
<i>2- ANALISI DEL GENE DI PERFORINA</i>	<i>pag. 19</i>
<i>3- ANALISI DELLA FUNZIONE NK</i>	<i>pag. 19</i>
DISCUSSIONE	<i>pag. 22</i>
BIBLIOGRAFIA	<i>pag. 25</i>

INTRODUZIONE

1- DIABETE DI TIPO 1 (T1D)

Il diabete di tipo 1 (T1D) rappresenta una delle più gravi forme cliniche di diabete mellito, in cui la distruzione delle cellule β del pancreas comporta generalmente l'incapacità di produrre insulina [1-4]. A tutt'oggi il T1D viene distinto in due forme: diabete mellito di tipo 1A (o immunomediato), che origina a seguito della distruzione delle cellule β e che può essere a insorgenza rapida (giovanile) o ad esordio lento (Latent Autoimmune Diabetes-LADA, in soggetti adulti) [2-4] e di tipo 1B (o idiopatico), meno frequente, le cui cause non sono ancora note e presente soprattutto in individui con discendenti asiatici o africani [5].

L'eziologia della malattia resta ancora in gran parte sconosciuta, anche se è ampiamente accettato che l'origine del disturbo sia multifattoriale, particolarmente legata ad un'interazione tra predisposizione genetica da una parte e fattori ambientali dall'altra [6-8]. La suscettibilità genetica è stata ampiamente dimostrata per particolari combinazioni genetiche degli antigeni HLA: nello specifico sono stati identificati aplotipi predisponenti la malattia (DQA1*0301-DQB1*0302 e DQA1*0501-DQB1*0201) e protettivi (DQA1*0102-DQB1*0602) [2]. Altri geni associati sia a rare sindromi, come i geni AIRE e Foxp3, che a condizioni di autoimmunità, ad esempio PTPN22 e CTLA-4, sembrano svolgere un ruolo nella patogenesi del T1D [9].

I fattori ambientali coinvolti nell'innescare della risposta autoimmune, che danno inizio alla distruzione delle cellule β , comprendono: virus (enterovirus, rosolia congenita, coxsackie virus) [10, 11], tossine (nitrosamine) [12] e alimenti (proteine del latte, cereali, glutine) [13-17].

L'eccessiva attivazione del sistema immunitario mediato dalle cellule T in soggetti predisposti, porta ad una risposta infiammatoria all'interno delle isole pancreatiche (insuliti) e ad una risposta umorale (mediata dai linfociti B) che conduce alla produzione di anticorpi diretti contro antigeni pancreatici. Sono stati individuati numerosi anticorpi rivolti verso le varie strutture delle isole pancreatiche, attualmente entrati anche nell'uso diagnostico: **ICA** (Islet Cell Autoantibodies) [18] rivolti ad antigeni bersaglio dell'insula estremamente eterogenei; sono presenti nella maggioranza dei casi di diabete 1A già in fase prediabetica, nel 70% dei casi all'insorgenza della malattia, nel 50% dopo sei mesi, nel 35% dopo due anni e nel 15% oltre i due anni. **GADA** (Glutamic Acid Decarboxylases Autoantibodies) [19] sono rivolti contro la Glutammato Decarbossilasi (GAD) da 65 kDa prevalentemente; sono presenti in circa il 60% dei casi di diabete di tipo 1A, sono caratterizzati da prolungata persistenza dopo l'esordio della malattia e sono quindi

determinanti nella diagnosi del LADA. **IA-2** (IA-2A Autoantibodies) sono rivolti contro una tirosinfosfatasi che interviene nel trasporto dei segnali dal citoplasma alle vescicole secretorie delle cellule. Sono presenti in circa il 40% dei casi, caratterizzerebbero il rapido evolvere della malattia verso l'insulina-dipendenza e sono più frequenti nei giovani. **IAA** (Insulin Autoantibodies) [20] rivolti contro l'insulina nativa; sono un marcatore precoce di autoimmunità, nella prima infanzia sono i più frequentemente trovati (presenti in > 90% dei casi) e spesso in tale età la loro comparsa precede quella degli ICA, dei GADA e degli IA-2; sono caratterizzati da rapida scomparsa.

Un'evidenza che supporta la patogenesi autoimmune del T1D deriva dalla suscettibilità dei pazienti a sviluppare altre condizioni autoimmuni quali la tiroidite di Hashimoto, la malattia di Graves, la malattia di Addison, il morbo celiaco, e la miastenia grave [21–24].

L'associazione tra una risposta iperattiva del sistema immunitario e il T1D è dimostrato nei topi NOD (Non-Obese Diabetic), modello animale più comunemente studiato di diabete spontaneo, nei quali l'eliminazione dei linfociti T impedisce lo sviluppo di T1D; inoltre il trasferimento di cellule T da un donatore malato ad un ricevente sano si associa all'induzione della malattia [25].

Il mimetismo molecolare associato ad infezioni rappresenta una delle ipotesi per spiegare l'autoimmunità nel T1D, tuttavia è evidente che il precoce rimodellamento e /o omeostati che si assiste nella massa delle cellule β coinvolge il meccanismo apoptotico all'interno delle cellule stesse [26] che può innescare a sua volta l'autoimmunità.

Anche se la relazione tra apoptosi delle cellule β e autoimmunità rimane ancora da stabilire in modo completo, esistono evidenze per cui l'apoptosi mediata dalle cellule T rappresenta un meccanismo dominante nel T1D [25].

Sia i linfociti T-Helper ($CD4^+$) che i Citotossici ($CD8^+$) rappresentano importanti effettori finali nella distruzione delle cellule β [27–29], ma anche i macrofagi e le cellule dendritiche giocano un ruolo importante, non solo come cellule presentanti l'antigene, ma anche come fonte di radicali dell'ossigeno o di altri mediatori citotossici solubili [30].

Tuttavia, mentre sono note le cellule effettrici ed il loro ruolo nello sviluppo della malattia, ancora molto discusso rimane il capitolo riguardante le molecole coinvolte nella morte delle cellule β .

Perforina, Fas e il suo ligando (FasL), $TNF\alpha$, IL-1, $INF\gamma$, NO sono tutte molecole che sembrano coinvolte nell'apoptosi cellulare, anche se non è ancora nota quale sia tra queste la molecola che svolge il ruolo cruciale nella fase finale di sviluppo della malattia [31].

Diversi lavori riportano l'utilizzo di Fas (recettore di morte che induce apoptosi nei linfociti attivati) da parte dei CTL nell'apoptosi delle cellule β [32–34], un ruolo confermato anche attraverso la nostra identificazione di una sostanziale popolazione di pazienti T1D che presentano una difetta

funzionalità della proteina [35]. Il ruolo di Fas nella risposta immune è confermato nei pazienti affetti da Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS), rara malattia autoimmune caratterizzata manifestazioni autoimmuni eterogenee e accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari, caratterizzati da difetti ereditari della funzionalità di Fas [36–39].

Un'altra molecola ampiamente associata alla distruzione delle cellule β è perforina. I granuli dei CTL e delle cellule natural killer (NK) contengono perforina e granzimi, che vengono rilasciati sulle cellule bersaglio dopo il riconoscimento da parte delle cellule citotossiche. Perforina polimerizza sulla membrana delle cellule bersaglio formando dei pori che permettono l'ingresso di granzimi, i quali innescano l'apoptosi nella cellula bersaglio attraverso l'attivazione delle caspasi [40]. La citotossicità mediata da perforina svolge un ruolo cruciale anche nell'eliminazione delle cellule infettate da virus e nello spegnimento della risposta immunitaria [41–43].

Il ruolo di perforina nel T1D è confermato anche nei topi NOD, infatti, l'eliminazione di perforina riduce sensibilmente l'incidenza del diabete nei topi NOD e inoltre blocca l'insorgenza del diabete indotto da virus nei topi transgenici RIP-LCMV [44, 45], suggerendo quindi un ruolo importante della proteina sia nei modelli spontanei di diabete che in quelli artificiali.

2-PERFORINA

I linfociti citotossici (CL), che comprendono i linfociti T citotossici (CTL) e le cellule natural killer (NK), sono in grado di riconoscere cellule infettate da virus o cellule trasformate e di distruggerle attraverso meccanismi perforina-dipendenti e/o utilizzando recettori di morte. Entrambi questi meccanismi rappresentano sistemi fondamentali per l'immuno sorveglianza e l'immuno regolazione.

I granuli presenti all'interno dei CL contengono perforina ed altre proteine pro-apoptotiche che vengono segregate insieme al fine di uccidere le cellule bersaglio.

Perforina, codificata da un gene presente in singola copia ed altamente conservato tra le specie (dai pesci ai primati), svolge un ruolo cruciale per il funzionamento degli altri costituenti dei granuli citotossici (ad es. granzimi), coinvolti anch'essi nell'induzione della morte delle cellule bersaglio, tramite meccanismi caspasi-dipendenti e/o caspasi-indipendenti [46].

L'esocitosi dei granuli citotossici avviene a seguito della formazioni di sinapsi immunologiche tra i CL e le cellule bersaglio; la fusione dei granuli con la membrana plasmatica si risolve con il rilascio di perforina e serino-proteasi pro-apoptotiche (granzimi) insieme ad altre molecole quali granulosa e chemochine.

Perforina è una proteina di circa 67 kDa, in grado di formare pori sulla membrana delle cellule bersaglio; la sua espressione è regolata durante il differenziamento linfocitario da segnali di recettori di attivazione (recettori delle cellule T, NKG2D) e da citochine (IL-2, IL-15, IL-21).

Il gene umano di perforina, localizzato sul cromosoma 10q22 [47], è costituito da tre esoni, due dei quali (esone 2 e 3) codificanti la proteina di 555 aminoacidi.

La proteina presenta una sequenza segnale di 21 aa, seguita da un dominio centrale con forte omologia con la proteina C9 del complemento che si ritiene formare un' α elica antipatica in grado di inserirsi nel doppio strato lipidico della cellula bersaglio.

Approssimativamente, gli ultimi 200 aa della sequenza di perforina vanno a costituire due domini che sono stati identificati in precedenza in altre famiglie di proteine: un dominio EGF-like (Epidermal Growth Factor) e una regione di circa 130 aa omologa al dominio C2 della protein-chinasi C [48, 49].

Il dominio C2 all'estremità carbossil-terminale di perforina mostra una stretta omologia di sequenza con il dominio C2 di altre proteine Ca^{2+} -dipendenti coinvolte nel traffico vescicolare o nella trasduzione del segnale [50–52]. Recenti studi hanno dimostrato il ruolo cruciale di questo dominio nella prima fase dell'attività membranolitica di perforina, la fase di legame alla membrana Ca^{2+} -dipendente [53].

Diversamente dalle altre proteine contenenti un dominio C2, perforina sembra esercitare la sua attività nel compartimento extracellulare, dove la concentrazione di Ca^{2+} libero è alta ($> 1 \text{ mM}$). Ne consegue che la proteina necessita almeno di una concentrazione $100 \mu\text{M}$ di Ca^{2+} per legare efficientemente la membrana della cellula bersaglio. La bassa affinità di perforina per il Ca^{2+} potrebbe d'altronde essere necessaria per proteggere i CL dall'autolisi durante la sintesi di perforina e il suo traffico all'interno della cellula. Inoltre, l'accumulo di perforina nei granuli, all'interno dei quali il pH viene mantenuto basso (< 5), si risolve nella protonazione dei residui di aspartato all'interno del dominio C2 necessari per legare il Ca^{2+} , non permettendo quindi il legame alla membrana e impedendo l'attivazione di perforina prima della sua esocitosi.

La proteina contiene due siti di N-glicosilazione. Viene sintetizzata come precursore inattivo: una volta processato nel carbossiterminale, rilascia circa 20 aminoacidi e si trasforma nella sua forma attiva [49] (**Figura 1**). In seguito alla sintesi nel reticolo endoplasmatico rugoso, le molecole di perforina si spostano attraverso i compartimenti del Golgi dove continua la modificazione post-traduzionale e vengono infine impaccate nei granuli litici dei CTL e delle cellule NK.

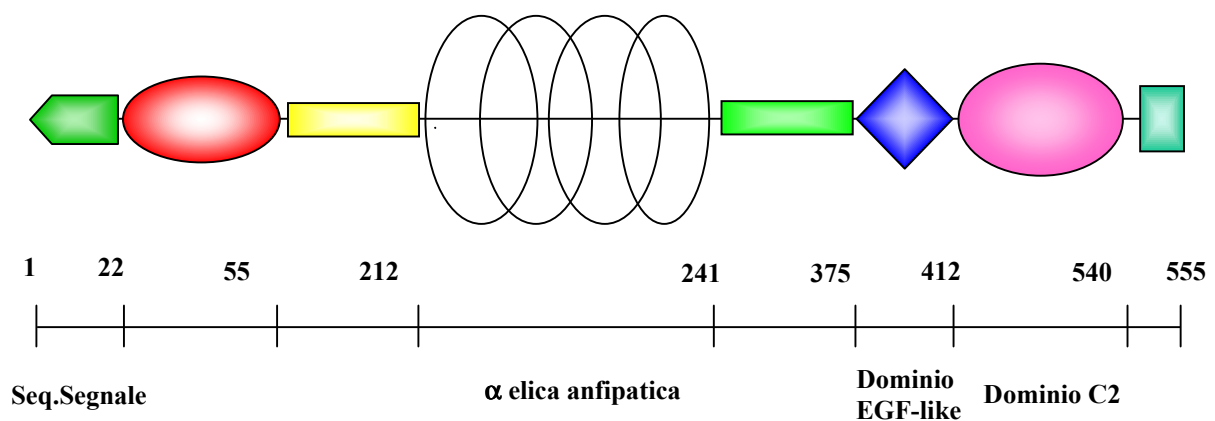


Figura 1. Domini strutturali di perforina.

2.1 Deficit di perforina nell'uomo: la Linfoistocitosi Emofagocitica Familiare (FHL)

La Linfoistocitosi Emofagocitica (HLH) è una malattia caratterizzata da una condizione iperinflammatoria determinata da un'incontrollata inefficace risposta immune. I sintomi diagnostici comprendono: febbre persistente, splenomegalia, citopenia, ipertrigliceridemia e/o fibrinopenia ed emofagocitosi a livello del sistema reticolo-endoteliale [54].

Generalmente la HLH viene classificata in forma primaria (o familiare, FHL) e secondaria [55, 56].

La diagnosi di FHL, condizione autosomica recessiva, è legata alla familiarità della malattia e, anche se non sempre uno studio familiare è possibile, la recente identificazione di difetti genetici nei pazienti FHL ha reso la diagnosi più accurata.

Le mutazioni identificate cadono nel gene di Perforina (*PRF1*) nei pazienti FHL2 [57–64], nel gene di Munc13-4 (*UNC113D*) nei pazienti FHL3 [64–66] e nel gene di Syntaxin11 (*STX11*) nei pazienti FHL4 [64, 67, 68].

Nel complesso, mutazioni a carico di Munc13-4, Syntaxin11 e Perforina sono responsabili del 30-70% dei casi di FHL, suggerendo che altri difetti genici che possono predisporre all'FHL devono ancora essere identificati.

Perforina è coinvolta nella citotossicità mediata dai granuli presenti nelle cellule NK e nei CTL e, dopo l'identificazione di mutazioni nel suo gene, è stato possibile stimare che la FHL2 può svilupparsi anche dopo l'infanzia, fino ai primi cinquant'anni di vita [69], mentre l'insorgenza della HLH è tipicamente giovanile [70].

Nei pazienti affetti da HLH l'attività citotossica dei CTL e delle cellule NK è severamente ridotta, se non assente e le mutazioni in perforina coincidono con una marcata riduzione della funzionalità e stabilità della proteina [57, 60, 62]. I linfociti citotossici dei pazienti HLH sono incapaci di eliminare le cellule bersaglio e reprimere le cellule presentanti l'antigene. Questo determina un'attivazione ed un'espansione incontrollata dei linfociti T CD4+ e CD8+ ed una eccessiva produzione di citochine infiammatorie [71]

Tra le molte variazioni note in perforina, la sostituzione nucleotidica +272C/T, che determina a livello proteico il cambiamento dell'Alanina in posizione 91 con una Valina (A91V), rappresenta la variazione più comune identificata in perforina, con una frequenza allelica che varia tra 3% e 17% in diverse popolazioni di controlli [63, 72, 73].

Molti studi hanno suggerito un nesso tra la A91V e forme atipiche (tardive nello sviluppo) di FHL2 [63, 69, 72, 74]. È stato inoltre proposto un ruolo della variazione nella predisposizione di diversi tipi di tumore, inclusi linfomi a cellule T e B [75] e nella Leucemia Acuta Linfoblastica (ALL) dei bambini [76]. Infine, recentemente, la variazione è stata associata anche alla DALD (Dianzani

Lymphoproliferative Disease) [77]. Nella maggior parte dei casi (ad eccezione dei pazienti FHL), la A91V si manifesta in eterozigoti, anche se sono stati individuati alcuni casi di omozigosi sia nella ALPS che nella DALD. A livello proteico, la variazione A91V sembra alterare la conformazione della proteina riducendone l'attivazione proteolitica ed aumentando la sua degradazione [78, 79].

Un altro polimorfismo sospetto di perforina, che determina il cambiamento amino acidico N252S, è stato individuato in pazienti FHL che hanno sviluppato la malattia in età molto precoce [57, 62].

La variazione è stata recentemente associata alla Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS), dove è stato dimostrato aumentare il rischio di sviluppare la malattia di circa 63 volte [77].

SCOPO DEL LAVORO

Recentemente nel nostro laboratorio è stato dimostrato che la sostituzione A755G del gene di perforina, che determina a livello aminoacidico il cambiamento dell'asparagina in posizione 252 con una serina (N252S), rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo della Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS), rara malattia autoimmune ereditaria causata da difettiva funzionalità di Fas. E' stato anche dimostrato che la variazione C272T nello stesso gene, che conduce alla sostituzione aminoacidica A91V è associata allo sviluppo della DALD (variante incompleta dell'ALPS).

Essendo noto il coinvolgimento di perforina, proteina ad attività citolitica presente nei granuli dei linfociti citotossici (CTL) e delle cellule natural killer (NK), nel meccanismo di distruzione delle cellule β del pancreas che si assiste nel Diabete di Tipo 1 (T1D), abbiamo deciso di valutare se le due variazioni di perforina associate all'ALPS/DALD, potessero rappresentare un fattore di rischio anche per lo sviluppo di una malattia autoimmune più comune come il T1D.

MATERIALI E METODI

1-PAZIENTI

Per lo studio del gene di perforina abbiamo analizzato due popolazioni indipendenti di pazienti affetti da T1D e di controlli sani etnicamente correlati e selezionati casualmente. La prima popolazione comprende 352 pazienti e 816 controlli, la seconda 365 pazienti e 964 controlli. Sia i pazienti che i controlli sono Caucasici e Italiani.

Pazienti e controlli sono stati reclutati dal Centro di Diabetologia dell'Ospedale Maggiore di Novara, dall'Ospedale S. Giovanni Battista di Torino e dall'Ospedale Pediatrico Regina Margherita di Torino, dall'Ospedale Pediatrico Gianna Gaslini e dall'Università di Genova, dal Policlinico S. Matteo di Pavia.

Tutti i pazienti hanno fornito il consenso informato, in accordo con la Dichiarazione di Helsinki (International Committee of Medical Journal Editors, 1995). Lo studio è stato effettuato secondo le linee guida del comitato etico locale.

2-ESTRAZIONE DI DNA DA SANGUE

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

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

Al surnatante si è aggiunto etanolo assoluto in rapporto 1:1 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).

3-MISURAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI ALLO SPETTROFOTOMETRO

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

50 µg/ml corrispondono a 1 O.D._{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.

4-PCR (Polymerase Chain Reaction)

L'esone 2 e 3, codificanti il gene perforina, sono stati amplificati mediante l'utilizzo della Taq polimerasi (Invitrogen), da campioni di DNA genomico estratto da pazienti T1D e da controlli sani. La reazione di PCR è stata allestita con 100-300 ng di DNA utilizzando i *primers* descritti in **Tabella 1**.

	PRIMERS
Perforina EX-2	F:5'-cccttccatgtgccctgataatc-3' R:5'-aagcagcctccaagtttgattg-3'
Perforina EX-3	F:5'-ccagtcctagttctgccacttac-3' R:5'-gaacccttcagccaagcatac-3'

Tabella 1. *Primers* utilizzati per amplificare gli esone 2 e 3 di perforina; (F=forward; R=reverse).

La miscela di reazione è composta dal tampone di reazione (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0,5 µM di ciascun oligonucleotide, 0,2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi, e 1U Taq DNA polimerasi (5U/µl) (Invitrogen). Le reazioni di PCR necessitano di MgCl₂: esso era concentrato 1 mM nella reazione di amplificazione dell'esone 2 e 2 mM per l'esone 3. Le condizioni di reazione sono le seguenti:

Esone-2:

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

Esone-3:

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

5- ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO

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

6- SEQUENZIAMENTO AUTOMATICO

Nella prima popolazione di pazienti e controlli, i prodotti di PCR, sono stati purificati dall'eccesso di primers e di nucleotidi non incorporati, utilizzando gli enzimi EXO e SAPI (ditta USB) tramite un ciclo di incubazione di 20' a 37°C e uno di 20' a 80°C.

Le reazioni di sequenziamento sono quindi state ottenute servendosi del kit specifico ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v1.1 (Applied Biosistem), dotati di dideossinucleotidi ciascuno legato ad un fluorocromo differente. Seguendo il protocollo consigliato dalla ditta, per un volume finale di reazione di 10 µl, sono stati addizionati al DNA purificato, 2 µl di BigDye Sequencing Buffer (in dotazione con il kit) , il primer (3,2 µM/µl). Oltre ai primers utilizzati per l'amplificazione, sono stati utilizzati due primers interni per l'esone 3 (forward: 5'-CAGGTCAACATAGGCATCCACG-3'; reverse 5'-GAACAGCAGGTTCGTTAATGGAG-3'). 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 µl del purificato sono stati addizionati a 10 µl di formammide, denaturati (3' a 95°C), e caricati su piastra ottica per la successiva analisi al sequenziatore.

7-DISCRIMINAZIONE ALLELICA MEDIANTE TAQMAN 5'

Nella seconda popolazione di pazienti e controlli, la genotipizzazione delle variazioni in posizione +272 C/T (A91V) e +755 A/G (N252S), sono state effettuate utilizzando il procedimento di discriminazione allelica mediante TaqMan 5' (Applied Biosystem). Primers allele specifici e sonde fluorogeniche sono state utilizzate per la discriminazione (per la sostituzione +272 C/T vedere ref **80**; per la posizione +755 A/G Cod. 4351376, Applied Biosystem).

La genotipizzazione per ogni soggetto è stata ottenuta automaticamente attraverso il software SDS 1.3 per la discriminazione allelica.

8-SAGGIO DI CITOTOSSICITA'

Il saggio di citotossicità è stato effettuato misurando il rilascio di ⁵¹Cr 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 ⁵¹Cr (30 µCi [1.11 MBq]/10⁶ 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 5X10³ 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 ⁵¹Cr nel campione - rilascio di ⁵¹Cr spontaneo / Rilascio di ⁵¹Cr totale - rilascio di ⁵¹Cr spontaneo) x 100.

9-VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI PERFORINA

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).

10-ANALISI STATISTICA

Le frequenze alleliche sono state calcolate con il test del χ^2 . I valori di p sono stati calcolati tenendo conto di tutti i parametri necessari.

La comparazione dell'attività delle cellule NK e dell'espressione di perforina è stata effettuata utilizzando il test Mann-Whitney.

RISULTATI

I-RICERCA DELLE VARIAZIONI N252S E A91V DI PERFORINA

Nel gene di perforina, la sostituzione C/T in posizione 272 del cDNA (la numerazione è riferita all'ATG=+1) (accession number: M28393) e la sostituzione A/G in posizione 755 determinano rispettivamente le variazioni aminoacidiche A91V e N252S a livello proteico. Entrambe queste variazioni sono state associate all'HLH e all'ALPS.

Attraverso il sequenziamento del DNA genomico, abbiamo inizialmente analizzato una popolazione composta da 352 pazienti T1D e 816 controlli per identificare la frequenza delle sopra citate variazioni.

La variazione N252S è stata individuata in 9 pazienti e 2 controlli, in entrambi i casi solo in eterozigosi. La frequenza allelica della variazione è risultata significativamente più alta nei pazienti (1,3%) rispetto ai controlli (0,1%; $p=0,0006$), conferendo un $OR=10,55$ (95% $CI=2,13-70,82$) allo sviluppo del T1D (**Tabella 1**).

La sostituzione A91V è stata trovata in 19 pazienti T1D (18 in eterozigosi e 1 in omozigosi) e 72 controlli (69 in eterozigosi e 3 in omozigosi); la sua frequenza allelica non è risultata significativamente diversa nei due gruppi (2,8% nei pazienti e 4,6% nei controlli) (**Tabella 2**).

	PAZIENTI T1D		CONTROLLI	
GENOTIPO	N	%	N	%
NN	343	97,4	814	99,8
NS	9	2,6	2	0,2
SS	0	0	0	0
ALLELE				
N	695	98,7	1630	99,9
S	9	1,3	2	0,1
statistica	OR=10,55 (95% CI=2,13-70,82) p=0,0006			

Tabella 1. Frequenza della distribuzione della variazione N252S nella prima popolazione di pazienti T1D e controlli.

	PAZIENTI T1D		CONTROLLI	
GENOTIPO	N	%	N	%
AA	333	94,6	744	91,2
AV	18	5,1	69	8,5
VV	1	0,3	3	0,3
ALLELE				
A	684	97,2	1557	95,4
V	20	2,8	75	4,6
statistica	NON SIGNIFICATIVO			

Tabella 2. Frequenza della distribuzione della variazione A91V nella prima popolazione di pazienti T1D e controlli.

Le frequenze di entrambe le variazioni nei controlli sono simili a quelle riportate in altri lavori e la loro distribuzione genotipica non devia significativamente dall'equilibrio di Hardy-Weinberg nelle due popolazioni (pazienti, controlli).

Questi risultati indicano che la variazione N252S, ma non la A91V, potrebbero essere un fattore predisponente per lo sviluppo del T1D.

Per confermare questi dati, abbiamo valutato entrambe le variazioni in una seconda popolazione di pazienti T1D (365) e di controlli (964) usando la tecnica di discriminazione allelica TaqMan 5'.

La variazione N252S è stata individuata in 13 pazienti e 13 controlli (sempre in eterozigosi). La sua frequenza allelica è significativamente più alta nei pazienti (1,8%) rispetto ai controlli (0,7%; $p=0,0179$) e conferisce un OR= 2,67 (95% CI=1,16-6,15) allo sviluppo della malattia (**Tabella 3**).

La sostituzione A91V è stata riscontrata in 36 pazienti (35 in eterozigosi, 1 in omozigosi) e 118 controlli (115 in eterozigosi, 3 in omozigosi) e la sua frequenza allelica non differisce significativamente nei due gruppi (5% nei pazienti; 6,3% nei controlli) (**Tabella 4**).

GENOTIPO	PAZIENTI T1D		CONTROLLI	
	N	%	N	%
NN	352	96,4	951	98,7
NS	13	3,6	13	1,3
SS	0	0	0	‘
ALLELE				
N	717	98,2	1915	99,3
S	13	1,8	13	0,7
statistica	OR=2,67 (95% CI=1,16-6,15) p=0,0179			

Tabella 3. Frequenza della distribuzione della variazione N252S nella seconda popolazione di pazienti T1D e controlli.

GENOTIPO	PAZIENTI T1D		CONTROLLI	
	N	%	N	%
AA	329	90,1	846	87,7
AV	35	9,6	115	11,9
VV	1	0,3	3	0,3
ALLELE				
A	693	95	1807	93,7
V	37	5	121	6,3
statistica	NON SIGNIFICATIVO			

Tabella 4. Frequenza della distribuzione della variazione A91V nella seconda popolazione di pazienti T1D e controlli.

La distribuzione genotipica delle due variazioni non deviano significativamente dall'equilibrio di Hardy-Weinberg nelle due popolazioni.

2- ANALISI DEL GENE DI PERFORINA

Per valutare se i pazienti appartenenti alle nostre casistiche possedessero altre variazioni nel gene di perforina, la sequenza codificante è stata completamente sequenziata in un campione di 200 pazienti T1D e 300 controlli.

Oltre alle variazioni A91V e N252S, abbiamo individuato altre quattro variazioni nucleotidiche già note in letteratura, ma che non sono state valutate in quanto variazioni che non determinano cambiamento aminoacidico, ne alterano i siti di *splicing*.

Due di queste variazioni (C822T e T900C) sono state descritte in precedenza come comuni polimorfismi non associate all' HLH. La loro frequenza è risultata simile nei pazienti e nei controlli. Le altre due sostituzioni (G435A e A462G) sono note per essere in perfetto *linkage disequilibrium* con la sostituzione N252S ed infatti sono state individuate solo nei soggetti portatori della variazione stessa [81].

Una nuova variazione è stata individuata in un paziente T1D: la sostituzione C1429G che determina, a livello proteico, il cambiamento della prolina in posizione 477 con una alanina (P477A). Questa sostituzione non è stata individuata in nessun soggetto di controllo.

3- ANALISI DELLA FUNZIONE NK

In precedenza abbiamo dimostrato, come in altri lavori, che l'attività NK non risulta diminuire in soggetti portatori della variazione N252S. Tuttavia, abbiamo descritto un paziente ALPS eterozigote per la sostituzione N252S, la cui attività NK risultava nella norma all'età di 12 anni, ma non dosabile all'età di 3 anni ed estremamente bassa all'età di 5 anni [77].

Abbiamo ipotizzato che, in questo paziente, la variazione N252S potesse essere associata a fattori che determinassero una diminuzione dell'attività NK nella giovinezza, seguita però da una normalizzazione ad opera di meccanismi compensatori non ancora noti.

Poichè in questo studio abbiamo individuato tre soggetti eterozigoti per la variazione N252S in età molto precoce, abbiamo deciso di valutare se la variazione N252S potesse essere associata ad un difetto dell'attività NK stimando la conta delle cellule NK, l'attività delle stesse e l'espressione di perforina nei PBMC dei pazienti (**Tabella 5**).

Due soggetti (Pz.1 e Pz.2) sono pazienti T1D, mentre il terzo soggetto è la sorella sana del Pz.1. Inoltre abbiamo esteso la stessa analisi anche al padre sano del Pz.1, omozigote per la variazione N252S, alla madre sana non portatrice della variazione e al paziente T1D portatore della mutazione P744A (Pz.3).

I risultati mostrano che l'attività NK è difettiva nel Pz.1, nella sorella e nel padre, mentre risulta diminuita, ma entro la norma, nella madre priva della sostituzione; tutti questi soggetti mostrano un'espressione normale di perforina.

Nel Pz.2, l'attività NK risulta borderline, mentre l'espressione di perforina mostra una diminuzione. Nel Pz.3 (portatore della mutazione P477A), sia l'attività NK che l'espressione di perforina risultano difettive.

La conta delle cellule NK è risultata nella norma in tutti i soggetti analizzati.

Variazione Perforina	Soggetto	Età	Attività NK*			Espressione		% cellule NK	
			(effettore/target)			Perforina †		in PBMC	
			100:1	30:1	10:1	%	MFI-R	CD3 ⁻ CD16 ⁺	CD3 ⁻ CD56 ⁺
N252S‡	Pz1	2	7 [§]	4 [§]	2	13	11	6	5
N252S‡	Sorella Pz.1	5	14 [§]	7 [§]	2	15	9	6	4
N252S	Padre Pz.1	30	8 [§]	4 [§]	2	23	7	7	9
-	Madre Pz.1	28	32	10	2	32	8	21	20
N252S‡	Pz.2	4	25	10	3	17	3.5 [§]	4	5
P477A‡	Pz.3	3	6 [§]	0 [§]	2	9	3 [§]	4 [§]	5
			40	26	14	23	9	11	17
	CONTROLLI¶		(15-66)	(8-50)	(2-31)	(17-26)	(5-20)	(5-31)	(4-27)

Table 5. Attività NK, espressione di perforina e conta delle cellule NK nei PBMC di pazienti T1D con la variazione N252S e P477A.

*: l'attività NK è espressa come % di lisi specifica e rappresenta la media di tre misurazioni le cui deviazioni standard sono sempre < 10% della media.. La lisi cellulare spontanea è sempre <10% della massima lisi cellulare.

†: l'espressione di perforina è rappresentata come proporzione di cellule positive (%) e rapporto di intensità media di fluorescenza (MFI-R).

‡: eterozigoti.

§: >5th percentile dei controlli.

||: omozigoti.

¶: mediana (5-95th percentile range) di 13 controlli.

DISCUSSIONE

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

Mutazioni bi-alleleliche del gene di perforina sono associate al 30% dei casi di linfoistocitosi emofagocitica familiare (FHL), rara immunodeficienza congenita [82].

In precedenza abbiamo dimostrato che variazioni nel gene di perforina possono rappresentare fattori di predisposizione allo sviluppo della Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS), rara malattia autoimmune ereditaria causata da difettiva funzionalità di Fas e alla DALD (variante incompleta dell'ALPS) [77].

Questo lavoro mostra che variazioni in perforina possono rappresentare fattori di suscettibilità anche nello sviluppo del T1D.

Delle due variazioni associate all'ALPS/DALD (N252S e A91V), solo la sostituzione N252S è risultata associata al T1D in quanto la sua frequenza allelica è significativamente più alta in due popolazioni indipendenti di pazienti T1D in confronto alle rispettive popolazioni di controlli.

In una prima popolazione composta da 352 pazienti T1D e 816 controlli la sostituzione è stata individuata in 9 pazienti e 2 controlli (sempre in eterozigosi). La sua frequenza allelica è risultata significativamente più elevata nei pazienti T1D (1,3%) rispetto ai controlli (0,1%); la sua presenza aumenta quindi il rischio di sviluppare la malattia di circa 11 volte (OR=10,55; 95% CI: 2,13-70,82 p=0,0006).

Per confermare questi dati, abbiamo quindi esteso la ricerca ad una seconda popolazione composta da 365 pazienti T1D e 964 controlli: la variazione N252S è stata individuata in 13 pazienti e 13 controlli (anche in questo caso solo in eterozigosi). La sua frequenza allelica è significativamente più alta nei pazienti (1,8%) rispetto ai controlli (0,7%) e conferisce un OR=2,67 (95% CI=1,16-6,15; p=0,0179) allo sviluppo della malattia.

Nella prima popolazione la variazione N252S aumenta il rischio di sviluppare la malattia di circa 11 volte, mentre nella seconda popolazione il rischio è aumentato di circa 3 volte. La differenza è probabilmente dovuta alla diversa frequenza della variazione nelle due diverse popolazioni di controlli (0,1% nella prima; 0,7% nella seconda).

Il rischio di sviluppare la malattia, calcolato sommando le due popolazioni (717 pazienti e 1780 controlli) è 3,68 (95% CI:1,83-7,48; p=0,00007), inferiore rispetto al rischio di circa 67 volte aumentato nello sviluppo dell'ALPS [77].

Questa differenza potrebbe essere dovuta all'alto *background* genetico che caratterizza i pazienti affetti da ALPS e che quindi potrebbe determinare un aumento dell'effetto della variazione N252S.

Questo spiegherebbe anche l'associazione della sostituzione A91V con l'ALPS che non si riscontra invece nel T1D.

Diversi lavori hanno dimostrato che la sostituzione A91V determina una diminuzione dell'attività di perforina alterando la sua conformazione, diminuendo il suo taglio proteolitico verso la forma attiva ed aumentando la sua degradazione [60, 78, 79, 83]. Il significato funzionale della variazione N252S continua, invece, ad essere molto dibattuto: la sostituzione cade in una regione di perforina detta MAC (*membrane-attack complex*), regione critica per la formazione di pori sulla membrana della cellula bersaglio, ma che è stata associata ad una normale funzione delle cellule NK e dell'espressione di perforina [57, 78, 79, 83].

Tuttavia questi studi sono stati condotti su cellule di soggetti N252S eterozigoti o in sistemi artificiali dove la forma mutata di perforina è stata trasfettata in linee cellulari per analizzarne l'espressione.

Recentemente abbiamo descritto un paziente ALPS, eterozigote per la variazione N252S, che mostrava un deficit nell'attività NK all'età di 3 e 5 anni, seguita da una normalizzazione all'età di 12 anni [77]. Per questo motivo abbiamo ipotizzato che la variazione N252S in eterozigosi da sola, o in associazione ad altri fattori, potesse determinare una diminuzione dell'attività NK in età giovanile.

I nostri dati condotti su pazienti T1D sostengono questa possibilità in quanto descrivono tre nuovi bambini eterozigoti per la variazione, con una ridotta funzionalità NK in età giovanile.

Uno studio nel corso degli anni potrebbe determinare dei meccanismi compensatori in grado di normalizzare la loro funzione NK.

In questo stesso studio abbiamo individuato anche una ridotta funzionalità NK in un soggetto adulto omozigote per la variazione N252S. In presenza di omozigosità questi meccanismi compensatori potrebbero non essere sufficienti.

Variazioni che alterano l'attività NK nella giovinezza potrebbero essere molto significativi in una malattia quale il T1D, in cui l'attacco autoimmune diretto verso le cellule β avviene generalmente in giovane età.

Interessante è risultata anche l'identificazione di un paziente T1D con una nuova sostituzione nucleotidica nel gene di perforina, C1429G, che determina, a livello proteico, la sostituzione della prolina in posizione 477 con una alanina, variazione non identificata in nessun soggetto di controllo e non associata a pazienti HLH.

La posizione della variazione all'interno del dominio C2 carbossil-terminale di perforina suggerisce una possibile rilevanza funzionale, infatti questo dominio gioca in ruolo cruciale nel legame Ca^{2+} -dipendente di perforina alla membrana della cellula bersaglio, prima fase dell'attività membrano-

litica di perforina [46]. Sulla base di tali considerazioni, la nostra analisi su PBMC di tale paziente hanno riscontrato un difetto dell'attività NK associato, però, ad una normale espressione della proteina. Di conseguenza, in aggiunta alla mutazione N252S, più frequente, altre sporadiche variazioni in perforina potrebbero favorire lo sviluppo del T1D e l'effetto di predisposizione globale della variazione nello sviluppo del T1D potrebbe essere maggiore rispetto a quello calcolato per la sola N252S.

Ciò nonostante, le variazioni nel gene di perforina rappresentano fattori rari di predisposizione alla malattia: l'N252S è presente nell'1,5% dei pazienti T1D e la P477A solo nello 0,5%.

La predisposizione alla malattia, mediata dalla sostituzione N252S, sembra necessitare della concomitante presenza degli alleli del complesso MHC noti per essere associati allo sviluppo del T1D, dal momento che circa l'80% dei pazienti che possiedono la N252S, sono anche portatori degli alleli di suscettibilità MHC; al contrario il paziente portatore della mutazione P477A non presenta alcun allele DR predisponente.

Nessuna differenza è stata individuata tra i pazienti portatori della mutazione N252S e gli altri pazienti T1D in termini di età di insorgenza della malattia o presenza di una seconda malattia autoimmune.

Nel complesso questi dati indicano che variazioni nel gene di perforina possono rappresentare fattori di predisposizione nello sviluppo del T1D.

I linfociti citotossici e le cellule NK, regolatori negativi della risposta immunitaria, attraverso perforina possono indurre la morte cellulare dei linfociti effettori e delle cellule presentanti l'antigene, inoltre la citotossicità mediata da perforina rappresenta uno dei sistemi effettori principali nell'eliminazione delle cellule infettate da virus [40–43, 84–88].

Il ruolo di perforina nell'autoimmunità potrebbe essere duplice: da un lato ridurre la capacità del sistema immunitario di eliminare le infezioni virali, dall'altro determinare un difettivo meccanismo di spegnimento della risposta immunitaria stessa.

Difetti in questi meccanismi potrebbero predisporre all'autoimmunità prolungando la risposta immune e aumentando il rischio di *cross-reazione* tra agenti virali e antigeni self tramite il fenomeno del mimetismo molecolare.

BIBLIOGRAFIA

1. American Diabetes Association. Clinical practice recommendations. *Diabetes Care*. 28 (suppl 1):1-79. **2005**.
2. Redondo MJ, Fain PR et al. Genetics of type 1A diabetes. *Recent Prog Horm Res*. 56: 69-89. **2001**.
3. Lambert AP, Gillespie KM et al. Absolute risk of childhood-onset type 1 diabetes defined by human leukocyte antigen class II genotype: a population-based study in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab*. 89: 4037-43. **2004**.
4. Devendra D, Liu E et al. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ*. 328: 750-54. **2004**.
5. Abiru N, Kawasaky E et al. Current knowledge of Japanese type 1 diabetes syndrome. *Diabetes Metab Res Rev*. 18:357-66. **2002**.
6. Bozzato GF et al. Clinical aspects of Immunology. *Scient Pub*. **1993**.
7. Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr. Rev*. 15:516. **1994**.
8. Bosi E, Todd I et al. Mechanism of autoimmunity: relevance to the pathogenesis of type I (insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev*. 3:893. **1987**.
9. Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet*. 367: 847-58. **2006**.
10. Lammi N, Karvonen M et al. Do microbes have a casual role in type 1 diabetes? *Med Scin Monit*. 11: RA63-69. **2005**.
11. Robles DT and Eisenbarth GS. Type 1A diabetes by infection and immunization. *J.Autoimmun*. 16:355-62. **2001**.
12. Helgason T and Jonasson MR. Evidence for a food additive as a cause of ketosis-prone diabetes. *Lancet*. 318: 716-20. **1981**.
13. Akerblom HK, Vaarala O et al. Environmental factors in the etiology of type I diabetes. *Am.J.Med.Genet*. 115:18-29. **2002**.

14. Virtanen SM, Laara E et al. Cow's milk consumption, HLA-DQB1 genotype, and type I diabetes: a nested case-control study of siblings of children with diabetes. Childhood diabetes in Finland study group. *Diabetes*. 49:912-17. **2000**.
15. Vaarala O, Knip M et al. Cow's milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infantsnat genetic risk for type I diabetes. *Diabete*. 48:1389-94. **1999**.
16. Thorsdottir I and Ramel A. Dietary intake of 10-to16-years-old children and adolescents in central and northern Europe and association with the incidence of type I diabetes. *Ann.Nutr.Metab*. 47: 267-75. **2003**.
17. Norris JM, Barriga K et al. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA*. 290:1713-20. **2003**.
18. Bottazzo GF, Florin-Christensen A et al. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*. 2(7892):1279-83. **1974**.
19. Baekkeskov S, Nielsen JH et al. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature*. 298(5870):167-9. **1982**.
20. Palmer JP, Asplin CM et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*. 222(4630):1337-9. **1983**.
21. Barker JM, Yu J et al. Autoantibody "subspecificity" in type 1 diabetes: risk gor organ-specific autoimmunity clusters in distinct groups. *Diabetes Care*. 28: 850-55. **2005**.
22. Kordonouri O, Hartmann R et al. Natural course of autoimmune thyroiditis in type 1 diabetes: association with gender, age, diabetes duration, and puberty. *Arch Dis Child*. 90(4):411-4. **2005**.
23. Kovbjerg H, Tarnow L et al. The prevalence of coeliac disease in adult Danish patients with type 1 diabetes with and without nephropathy. *Diabetologia*. 48(7):1416-7. **2005**.
24. Norris JM, Barriga K et al. Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *JAMA*. 293(19):2343-51. **2005**.

25. Lee SC and Pervaiz S. Apoptosis in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(3): 497-504. **2007.**
26. Trudeau JD, Dutz JP et al. Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? *Diabetes.* 49(1):1-7. Review. **2000.**
27. Wang Y, Pontesilli O et al. The role of CD4+ and CD8+ T cells in the destruction of islet grafts by spontaneously diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88(2): 527-31. **1991.**
28. Katz JD, Benoist C et. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science.* 268(5214):1185-8. **1995.**
29. Christianson SW, Shultz LD et al. Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes.* 42(1):44-55. **1993.**
30. Appels B, Burkart V et al. Spontaneous cytotoxicity of macrophages against pancreatic islet cells. *J Immunol.* 142(11):3803-8. **1989.**
31. Lee MS, Chang I et al. Death effectors of β -cell apoptosis in type 1 diabetes. *Mol Gen and Metab.* 83: 82-92. **2004.**
32. Chervonsky AV, Wang Y et al. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell.* 89(1):17-24. **1997.**
33. Itoh N, Imagawa A et al. Requirement of Fas for the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med.* 186(4):613-8. **1997.**
34. Yamada K, Takane-Gyotoku N et al. Mouse islet cell lysis mediated by interleukin-1-induced Fas. *Diabetologia.* 39(11):1306-12. **1996.**
35. DeFranco S, Bonisconi S et al. Defective function of Fas in patients with type 1 diabetes associated with other autoimmune diseases. *Diabetes.* 50(3):483-8. **2001.**
36. Straus SE, Sneller M et al. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Int Med.* 130:591-601. **1999.**

37. Sneller MC, Dale JK et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Rheum.* 15:417-21. **2003.**
38. Rieux-Laucat F, Le Deist F et al. Autoimmune Lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathway. *Cell Death Diff.* 10:124-133. **2003.**
39. Dianzani U, Chiochetti A et al. Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity. *Life Sciences.* 72: 2803-2824. **2003.**
40. Trapani J and Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Rev Immunol.* 2: 735-747. **2002.**
41. Su MW, Pyarajan S et al. SJ: Fratricide of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes is dependent on cellular activation and perforin-mediated killing. *Eur J Immunol.* 34: 2459-2470. **2004.**
42. Badovinac VP, Hamilton SE et al. Viral infection results in massive CD8⁺ T cell expansion and mortality in vaccinated perforin-deficient mice. *Immunity.* 18: 463-474. **2003.**
43. Zhou S, Ou R et al. Critical role for perforin-, Fas/FasL-, and TNFR1-mediated cytotoxic pathways in down-regulation of antigen-specific T cells during persistent viral infection. *J Virol.* 76: 829-840. **2002.**
44. Kagi D, Odermatt B et al. Development of insulinitis without diabetes in transgenic mice lacking perforin-dependent cytotoxicity. *J Exp Med.* 183(5):2143-52. **1996.**
45. Kagi D, Odermatt B et al. Reduced incidence and delayed onset of diabetes in perforin-deficient nonobese diabetic mice. *J Exp Med.* 186(7):989-97. **1997.**
46. Bolitho P, Voskoboinik I et al. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr Opin Immunol.* 19(3):339-47. **2007.**
47. Lichtenheld MG and Podack ER. Structure of the human perforin gene. A simple gene organization with interesting potential regulatory sequences. *J Immunol.* 143(12):4267-74. **1989.**

48. Lichtenheld MG, Olsen KJ et al. Structure and function of human perforin. *Nature*. 335(6189):448-51. **1988**.
49. Uellner R, Zvelebil MJ et al. Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain. *EMBO J*. 16(24):7287-96. **1997**.
50. Nalefski EA and Falke JJ. The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci*. 5(12):2375-90. Review. **1996**.
51. Pappa H, Murray-Rust J et al. Crystal structure of the C2 domain from protein kinase C-delta. *Structure*. 6(7):885-94. **1998**.
52. Sutton RB, Ernst JA et al. Crystal structure of the cytosolic C2A-C2B domains of synaptotagmin III. Implications for Ca(+2)-independent snare complex interaction. *J Cell Biol*. 147(3):589-98. **1999**.
53. Voskoboinik I, Thia MC et al. Calcium-dependent plasma membrane binding 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*. 280(9):8426-34. **2005**.
54. Henter J, Elinder G et al. Diagnostic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Semin Oncol*. 18:29-33. **1991**.
55. Arico M, Danesino C et al. Pathogenesis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol*. 114:761-769. **2001**.
56. Janka GE, Schneider EM. Modern management of children with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol*. 124: 4-14. **2004**.
57. Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R et al. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science*. 286(5446):1957-9. **1999**.

58. Ueda I, Morimoto A et al. Characteristic perforin gene mutations of hemophagocytic lymphohistiocytosis patients in Japan. *Br J Haematol.* 121: 503-510. **2003.**
59. Ishii E, Ueda I et al. Genetic subset of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: Correlations with clinical features and cytotoxic T lymphocyte/natural killer cell functions. *Blood.* 105: 3442-3448. **2005.**
60. Molleran Lee S, Villanueva J et al. Characterisation of diverse PRF1 mutations leading to decreased natural killer cell activity in North American families with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet.* 41(2):137-44. **2004.**
61. Ericson KG, Fadeel B et al. Spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am J Hum Genet.* 68: 590-597. **2001.**
62. Feldmann J, Le Deist F et al. Functional consequences of perforin gene mutations in 22 patients with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol.* 117: 965-972. **2002.**
63. Clementi R, Emmi L et al. Adult onset and atypical presentation of hemophagocytic lymphohistiocytosis in siblings carrying PRF1 mutations. *Blood.* 100: 2266-2267. **2002.**
64. zur Stadt U, Karin B et al. Mutation spectrum in children with primary hemophagocytic lymphohistiocytosis: Molecular and functional analyses of PRF1, UNC13D, STX11, and RAB27A 1. *Hum Mutat.* 27: 62-68. **2006.**
65. Feldmann J, Callebaut I et al. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell.* 115(4):461-73. **2003.**
66. Yamamoto K, Ishii E et al. MUNC13-4 mutations and cytotoxic function of MUNC13-4 deficient-T lymphocytes in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet.* 41: 763-767. **2004.**

67. zur Stadt U, Schmidt S et al. Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Hum Mol Genet.* 14(6):827-34. **2005.**
68. Yamamoto K, Ishii E et al. Mutations of syntaxin11 and SNAP23 genes as causes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis were not found in Japanese people. *J Hum Genet.* 50: 600-603. **2005.**
69. Mancebo E, Allende LM et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in an adult patient homozygous for A91V in the perforin gene, with tuberculosis infection. *Haematologica.* 1: 1257-1260. **2006.**
70. Arico M, Janka G et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis. Report of 122 children from the International Registry. *Leukemia.* 10: 197-203. **1996.**
71. Henter JI, Arico M et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: primary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 12: 417-433. **1998.**
72. Busiello R, Adriani M et al. Atypical features of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood.* 103(12):4610-2. **2004.**
73. zur Stadt U, Beutel K et al. A91V is a polymorphism in the perforin gene not causative of an FHLH phenotype. *Blood.* 104: 1909. **2004.**
74. Busiello R, Galgani M et al. Role of A91V mutation in perforin gene in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood.* 104: 1910**2004.**
75. Clementi R, Locatelli F et al. A proportion of patients with lymphoma may harbor mutations of the perforin gene. *Blood.* 105: 4424-4428. **2005.**
76. Santoro A, Cannella S et al. A single amino acid change A91V in perforin: a novel, frequent predisposing factor to childhood acute lymphoblastic leucemia? *Haematologica.* 90: 697-698. **2005.**
77. Clementi R, Chiocchetti A et al. Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective fas function. *Blood.* 108:3079-3084. **2006.**

78. Trambas CM, Gallo F et al. A single amino acid change, A91V, leads to conformational changes which can impair processing to the active form of perforin. *Blood*. 106 (3): 932-7. **2005.**
79. Voskoboinik, I, Thia M-C. et al. A functional analysis of the putative polymorphisms A91V and N252S, and 22 missense perforin mutations associated with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 105 (12): 4700-6. **2005.**
80. Mehta PA, Davies SM et al. Perforin polymorphism A91V and susceptibility to B-precursor childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology group. *Leukemia*. 20: 1539-41. **2006.**
81. Clementi R, Dagna L et al. Inherited perforin and Fas mutations in a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome and lymphoma. *N Eng J Med*. 351: 1419-1424. **2004.**
82. Kadano H and Cohen JI. Perforin and lymphohistiocytic proliferative disorders. *British Journal of Haematology*. 128: 739-750. **2004.**
83. Risma KA, Frayer et al. Aberrant maturation of mutant perforin underlies the clinical diversity of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Clin Invest*. 116: 182-192. **2006.**
84. Badovinac VO, Tvinnereim AR et al. Regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. *Science*. 290: 1354-1358. **2002.**
85. Marks L, Levy RB. The cytotoxic potential of regulatory T cells: what has been learned from gene knockout model systems? *Transplantation*. 77: S19-S22. **2004.**
86. De Saint Basile G, Fischer A. Defective cytotoxic granule-mediated cell death pathway impairs T lymphocyte homeostasis. *Curr Opin Rheumatol*. 15: 436-445. **2003.**
87. Beilke JN, Kuhl NR et al. NK cells promote islet allograft tolerance via a perforin-dependent mechanism. *Nat Med*. 11: 1059-1065. **2005.**
88. Bose A, Inoue Y et al. Cutting edge: perforin down-regulates CD4 and CD8 T cell-mediated immune responses to a transplanted organ. *J Immunol*. 170: 1611-1614. **2003.**

CORSI FREQUENTATI:

I° anno:

Corso di lingua inglese tenuto dal Prof. Irving Bell.

SEMINARI INTERNI AL DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

I° anno:

18 NOVEMBRE 2005-CARDIA POTASSIUM CHANNEL REGULATION BY ACCESSORY SUBUNITS.

Dott. Diego Cotella.

23 NOVEMBRE 2005-HCV-RELATED STEATOSIS:PATHOGENIC MECHANISM AND CLINICAL IMPLICATIONS.

Prof. Luigi Elio Adinolfi.

25 NOVEMBRE 2005. MECHANISM OF TRANSCRIPTIONAL REGULATION AND DISEASE.

Prof. Robert Tjian.

19 GENNAIO 2006-MECHANISMS OF OSTEOLYTIC LESIONS IN MULTIPLE MYELOMA: UNCOUPLING BETWEEN BONE RESORPTION AND FORMATION.

Prof.ssa Maria Grano.

13 FEBBRAIO 2006-NEW PERSPECTIVES IN METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS.

Prof. Ferdinando Nicoletti.

15 FEBBRAIO 2006-ANTICORPI RICOMBINANTI:UN POTENTE TOOL BIOTECNOLOGICO.

Prof. Daniele Sblattero.

13 MARZO 2006-IL TRAPIANTO DI CELLULE ENDOTELIALI (LSEC) NEL FEGATO DI TOPO HA IMPLICAZIONI PER LA TERAPIA CELLULARE E GENICA DELL'EMOFILIA.

Dott.ssa Atonia Follenzi.

20 MARZO 2006-THE NATURAL COURSE OF PRECLINICAL TYPE 1 DIABETES.

Prof. Mikael Knip.

6 APRILE 2006-ASPETTI IMMUNOGENETICI E TERAPEUTICI DELLA "HAIRY CELL LEUKEMIA".

Dott. Francesco Forconi.

20 APRILE 2006-TERAPIE MOLECOLARI NELLE MALATTIE MIELOPROLIFERATIVE.

Dott.ssa Daniela Cilloni.

4 MAGGIO 2006-IL MESOTELIOMA:UN MODELLO DI TERAPIA TRASLAZIONALE.

Dott. Luciano Mutti.

18 MAGGIO 2006-L'EPATITE AUTOIMMUNE.

Prof. Marco Lenzi.

30 MAGGIO 2006-SPERM MEDIATED GENE TRANSFER: STORIA E APPLICAZIONI.

Prof.ssa Marialuisa Lavitrano.

15 GIUGNO 2006-MELUSIN: A STRETCH SENSOR MOLECULE CONTROLLINO ADAPTIVE CARDIAC REMODELING TO PRESSURE OVERLOAD.

Prof. Guido Tarone.

27 GIUGNO 2006-OSTEOINTEGRAZIONE E SUPERFICI IMPLANTARI.

Prof.ssa Lia Rimondini.

5 LUGLIO 2006-DNA AND PROTEIN ARRAYS IN INFECTION DISEASES: FROM BASIC RESEARCH TO VACCINE DESIGN.

Dott.ssa Renata Grifantini.

II° anno:

10 GENNAIO 2007-GENE SILENCING BY RNA INTERFERENCE (RNAI)

Prof.ssa P. DeFilippi

17 GENNAIO 2007-DETECTION OF miRNA TARGET GENES THROUGH STATISTICAL ANALYSIS OF DNA MOTIFS IN HUMAN-MOUSE 3'-UTR REGIONS

Prof. M. Caselle

18 GENAIO 2007-PATOGENESI DEL DIABETE MELLITO DI TIPO 1: STIAMO VINCENDO O STIAMO PERDENDO?

Prof. GF Bottazzo

1 FEBBRAIO 2007-GENE THERAPY STRATEGIES FOR PHENYLKETONURIA

Prof. B. Thöny

22 FEBBRAIO 2007-FRAGILE X SYNDROME FROM RNA METABOLISM IMPAIRMENT TO SPINE DYSMORPHOGENESIS

Prof. C. Bagni

14 MARZO 2007 -PROTEIN MICROARRAYS DEVELOPMENT OF NEW SUPPORTS FOR IMPROVED SENSITIVITY

Dr. M. Cretich

15 MARZO 2007 -COLANGIOPATIE AUTOIMMUNI

Prof. M. Podda

16 MARZO 207 -MICROARRAYS DI TESSUTI: UNA STRATEGIA PER IDENTIFICARE NUOVI BIOMARCATORI TUMORALI

Dott.ssa M. Capra

16 MARZO 2007 -DROSOPHILA AS A MODEL FOE AGING AND CANCER

Dott: Bohmann

29 MARZO 2007 -MARCATORI FARMACOGENETICI NEL CARCINOMA COLORETTALE:
QUALI PROSPETTIVE PER UNA TERAPIA PERSONALIZZATA?

Prof. E. Mini

16 MAGGIO 2007-DIFETTI GENETICI DEL PRE-B CELL RECEPTOR

Prof. Ferrari

25 MAGGIO 2007-THE REGULATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS BY SMAD
SIGNALING

Dott. Karlsson

28 MAGGIO 2007-TRANSLATING BASIC SCIENCE INTO THERAPEUTIC STRATEGIES
FOR SHWACHMANN DIAMOND SYNDROME

Dott. Ellis

4 GIUGNO 2007-SINDROMI AUTINFIAMMATORIE

Prof. A Martini

21 GIUGNO 2007-BIOINFORMATICS TOOLS FOR THE ANALYSES OF UTRs AND FOR
THE PRODUCTION OF ALTERNATIVE SPLICE SITE

Prof. E Mignone

CONGRESSI FREQUENTATI:

I° anno: XXVIII Congresso Nazionale della Società italiana di Patologia, Università degli studi di Pavia, 19-22 Settembre, 2006.

II° anno: XIV Telethon Convention, Palazzo dei Congressi, Salsomaggiore Terme, 12-14 Marzo, 2007.

COMUNICAZIONE A CONGRESSI:

I° anno:

“Variazioni nel gene di perforina in pazienti con sclerosi multipla” Orilieri E., Cappellano G., Comi C., Chiocchetti A., Cerutti E., Castelli L., Monaco F., Dianzani U. (XXVIII Congresso Nazionale della Società italiana di Patologia, Università degli studi di Pavia, 19-22 Settembre, 2006). (PRESENTAZIONE POSTER).

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

“Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function” Cappellano G., Chiocchetti A., Cerutti E., Ferretti M., Orilieri E., Dianzani I., Ramenghi U., Dianzani U. (16th European Congress of Immunology; PARIS, 6-9-September, 2006). (POSTER).

II° anno:

“Search for genetic alterations of the Fas system in the autoimmune/lymphoproliferative syndrome (ALPS)”. Dianzani U., Chiocchetti A., Cappellano G., Orilieri E., Cerutti E., Ferretti M., Clementi R., Notarangelo L., Ramenghi U. (XIV Telethon Convention, Palazzo dei Congressi, Salsomaggiore Terme, 12-14 Marzo, 2007). (PRESENTAZIONE POSTER).

PUBBLICAZIONI:

Chiocchetti A, Miglio G, Mesturini R, Varsaldi F, Mocellin M, Orilieri E, Dianzani C, Fantozzi R, Dianzani U, Lombardi G. **Group I mGlu receptor stimulation inhibits activation-induced cell death of human T lymphocytes.** *Br J Pharmacol.* 148(6):760-8, 2006.

Clementi R, Chiocchetti A, Cappellano G, Cerutti E, Ferretti M, Orilieri E, Dianzani I, Ferrarini M, Bregni M, Danesino C, Bozzi V, Putti MC, Cerutti F, Cometa A, Locatelli F, Maccario R, Ramenghi U, Dianzani U. **Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective fas function.** *Blood.*108(9):3079-84, 2006.