

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



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

Relazione 1° anno

**TITOLO: RICERCA DI FATTORI GENETICI DI
SUSCETTIBILITA' AL LUPUS ERITEMATOSO
SISTEMICO**

**Candidato: Barizzone Nadia
Tutor: Prof.ssa Sandra D'Alfonso**

INTRODUZIONE

LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

Il *Lupus Eritematoso Sistemico* (LES) è una malattia autoimmune cronica ad eziologia multifattoriale, con una prevalenza media nelle popolazioni Caucasoidi Europee e Nord-Americane di circa 15-50 casi ogni 100.000 abitanti. E' più diffuso tra le donne in età fertile, con un rapporto di incidenza donna/uomo di 9:1, e nella popolazione Afro-Americana (Simard et al. 2007). La sintomatologia del LES è molto complessa, e può variare notevolmente da un paziente ad un altro. I sintomi più comuni e caratteristici includono l'eritema malare "a farfalla" che insorge sul volto del paziente nelle pieghe naso-labiali, artrite, glomerulonefrite, pleuriti o pericarditi, altri disturbi cutanei come le lesioni discoidi, l'alopecia ed il fenomeno di Raynaud (sbiancamento alle estremità indotto dall'esposizione a basse temperature) (Kotzin, 1996; Cervera et al. 1993). Il quadro immunologico è altrettanto complesso, ma è caratterizzato principalmente dalla presenza di autoanticorpi diretti contro antigeni nucleari (Cervera et al. 1993). La diagnosi di LES viene accertata qualora sussista la positività per almeno 4 dei criteri clinici ed immunologici definiti dall'*American Rheumatism Association* (ARA) (Wallace et al. 1993).

La patogenesi del LES è complessa, basata sull'interazione di fattori ambientali, come l'esposizione ai raggi U.V. e ad agenti infettivi (Kotzin, 1996; Hrycek et al. 2005; Simard et al. 2007), con altri fattori genetici ed immunologici. Nella maggior parte dei casi la causa principale del danno è dovuta alla formazione di immunocomplessi (IC) tra anticorpi IgG ed antigeni solubili ed alla precipitazione di IC e depositi di componenti del complemento a livello tissutale, soprattutto a livello renale (Brown et al. 2007; Sturfelt e Truedsson 2005).

Si hanno da tempo considerevoli evidenze di una base genetica nella suscettibilità al LES, derivanti da studi di aggregazione familiare e su gemelli. Il rischio per un parente di un malato di contrarre la malattia (λ) è stimato tra le 20 e le 80 volte superiore rispetto a quello per la popolazione generale (Lindqvist et al. 1999). Il tasso di concordanza per la presenza della malattia nei gemelli monozigotici è del 24%, contro un 2% di concordanza nei gemelli dizigotici. (Lindqvist et al. 1999; Deapen et al. 1992; Grennan et al. 1997). I fattori genetici coinvolti nella suscettibilità al LES sono moltissimi, ed includono i geni del complesso HLA (Wallace et al. 1993; Sirikong et al. 2002), quelli che codificano per: i regolatori negativi della risposta immunitaria (Lee et al. 2005; Prokunina et al. 2002; Prokunina et al. 2004; Lee et al. 2007), gli stimolatori dell'infiammazione (Hawn et al. 2005; Aguilar et al. 2001; Rovin et al. 1999), le componenti della via di traduzione dell'IFN- γ (Sigurdsson et al. 2005; Graham et al.

2006; Graham et al. 2007; Ferreiro-Neira 2007; Akahoshi et al. 2006; Tanaka et al. 1999), le citochine (D'Alfonso et al. 2000; Eskdale et al. 1997; Mehrian et al. 1998; Wilson et al. 1994; Sullivan et al. 1997; Magnusson et al. 2001; Blakemore et al. 1994; Linker-Israeli et al. 1999), i fattori di riparazione del DNA (Tsao et al. 1999; Lee-Kirsch et al. 2007), le proteine coinvolte nella clearance dei corpi apoptotici (Russell et al. 2004; Salmon et al. 1996; Song et al. 1998; Duits et al. 1995; Karassa et al. 2002, Li et al. 2003; Aitman et al. 2006) . Tra questi ultimi hanno particolare importanza alcune componenti della via classica di attivazione del complemento (C1q, C2, C4A e C4B), la cui mancanza o totale perdita di funzione è associata con un elevato rischio di contrarre la malattia (Colten, 1992; Lindqvist et al. 1999; Dragon-Durey et al. 2001; Rupert et al. 2002). In questi pazienti la parziale o totale soppressione di alcune funzioni del sistema del complemento, quali la clearance degli IC (Morgan et al. 1991), l'opsonizzazione di cellule apoptotiche (ritenute la principale sorgente di auto-antigeni nel LES) (Flierman et al. 2007), la partecipazione alla presentazione di antigeni self ai linfociti B immaturi per stimolarne l'eliminazione (Carrol 2004), sembra essere il principale fattore che concorre allo scatenarsi della malattia.

PROTEINE REGOLATORIE DEL COMPLEMENTO-CLUSTER RCA

Data la rapidità della cinetica dell'attivazione della cascata del complemento e la potenza derivante dalla sua amplificazione è necessario uno stretto controllo per evitare un'attivazione incontrollata che condurrebbe ad un danno cellulare o ad un eccessivo consumo delle componenti complementari, che porterebbe all'incapacità di attivare nuovamente il sistema in un nuovo sito di infezione, o ad un'inefficace clearance degli immunocomplessi. L'attivazione del complemento è strettamente regolata a diversi livelli, attraverso il decadimento spontaneo dei complessi di attivazione e tramite una serie di proteine inibitorie plasmatiche o ancorate alla superficie cellulare.

Alcune delle proteine regolatorie umane dell'attivazione del complemento sono codificate da un cluster di geni situato sul braccio lungo del cromosoma 1 (1q32). Questa regione prende il nome di cluster RCA (regulators of complement activation). Essa contiene i geni codificanti per i fattori complement receptor type one (CR1), complement receptor type two (CR2), decay accelerating factor (DAF), membrane cofactor protein (MCP), C4-binding protein (C4BP) e fattore H. C4BP è costituito da due diverse subunità, codificate entrambe nella regione cromosomica 1q32 (*C4BP α* e *C4BP β*). Inoltre il cluster comprende altri elementi genici che sembrano essere forme parzialmente duplicate dei geni RCA. Le proteine codificate in questa regione presentano una significativa omologia a livello di sequenza aminoacidica, ma

dimensioni differenti. Sono tutte costituite da un numero variabile di ripetizioni in tandem di elementi SCRs (short consensus repeats). Ogni SCR è costituito da circa 60-70 aminoacidi altamente conservati, che includono 4 cisteine. Le cisteine sono legate tra loro da ponti disolfuro, che conferiscono all' SCR una struttura rigida a doppio loop formata da un core idrofobico compatto circondato da cinque o più strands organizzati in una conformazione a b-sheet. (Krushkal et al. 2000; Blom 2001; Kim et al. 2006).

CR1 è la proteina più complessa come organizzazione, struttura e funzioni dell'intero cluster RCA. E' una grande glicoproteina transmembranaria a singola catena con quattro diverse varianti alleliche (denominate A, B, C e D) che differiscono tra loro per dimensione. La variante più comune (A) è composta da 30 SCR, organizzati in base all'omologia della sequenza in quattro ripetizioni in tandem di sette SCR ciascuno (LHR:long homologous repeat) (Birmingham et al. 2001). I quattro LHR mostrano un'omologia superiore al 90%. Anche le regioni introniche del gene *CR1* presentano un'omologia estremamente elevata. Le quattro varianti alleliche di lunghezza (A, B, C e D) differiscono per il numero di LHR da cui sono costituite (Birmingham et al. 2001). CR1 è espresso negli eritrociti, nei linfociti B, nelle cellule follicolari dendritiche, nei polimorfonucleati, nei podociti glomerulari e nei macrofagi (Wong et al. 1989; Miwa et al 2001). Approssimativamente il 90% del CR1 circolante si trova sulla membrana degli eritrociti, dove svolge un ruolo fondamentale nella clearance degli IC. CR1 è un recettore multifunzionale nella sua specificità di legame, che svolge un ruolo centrale nel sistema del complemento. Lega C4b, C3b, C3bi, C1q (Klickstein et al. 1997; Tas et al. 1999) ed è anche in grado di legare MBL (Ghiran et al. 2000). Il ruolo principale di CR1 sulle membrane eritrocitarie è di mediare il legame ed il trasporto al fegato ed alla milza degli IC o delle particelle che hanno fissato opsonine del complemento. Inoltre CR1 è stato identificato come l'antigene eritrocitario responsabile del gruppo sanguigno di Knops/McCoy (Rao et al. 1991).

L'espressione di CR1 sulla membrana degli eritrociti (E-CR1) è quantitativamente regolata da due varianti alleliche agenti in cis in linkage disequilibrium con un SNP nell'introne 27 di CR1 che produce un RFLP per Hind III. Le due varianti vengono comunemente denominate H (high) ed L (low). Gli individui omozigoti per l'allele L esprimono fino a 10 volte di meno E-CR1 rispetto agli omozigoti per l'allele H (Herrera et al.1998). Le membrane eritrocitarie di pazienti affetti da LES esprimono quantità molto più ridotte di CR1 rispetto ai controlli sani, e la misurazione combinata dei livelli di E-CR1 ed E-C4d è stata proposta come criterio diagnostico (Manzi et al. 2004). Per questa ragione sono stati condotti numerosi studi di associazione, su popolazioni diverse, tra il LES ed il polimorfismo funzionale H/L e quello

strutturale di lunghezza di *CRI*. Nel 2005 Nath et al. hanno effettuato una meta-analisi tra gli studi di associazione presenti in letteratura. La loro analisi statistica conferma l'associazione tra LES ed allele B (OR = 1,54), nonostante questa fosse risultata significativa solo in due studi individuali su nove. Nessuna associazione è invece stata riscontrata con il polimorfismo H/L, né negli studi singoli, né a livello di meta-analisi.

L'elemento genico *CRIL* mappa a circa 50 kb telomericamente rispetto a *CRI*, ed è stato individuato per la prima volta tramite mappaggio di restrizione di cloni fagici (Wong et al. 1989), e successivamente caratterizzato attraverso cloni cosmidici. Presenta il 95% di omologia con il gene *CRI* a livello di sequenza nucleotidica, ed il 91% a livello di sequenza aminoacidica ed è costituito da sette SCR. I primi sei SCR sono molto simili agli SCR 1-6 di *CRI*, mentre il settimo mostra l'omologia più stringente con l'SCR 9 sempre di *CRI*. I geni *CRI* e *CRIL* sono probabilmente originati da un unico gene ancestrale attraverso eventi successivi di delezione o mutazioni seguiti da duplicazione (McLure et al. 2004 e 2005). A differenza di quanto accade col *CRIL* dei primati non umani, non ci sono ancora prove certe che *CRIL* sia espresso in *homo sapiens*. Tuttavia l'evidenza che in questi primati *CRIL* sia una proteina funzionale ha condotto a studi sull'espressione di *CRIL* umano. Logar et al. (2004) hanno scoperto un trascritto di *CRIL*, tramite RT-PCR, da RNA di midollo osseo di umano adulto, e da vari tessuti linfoidei fetali (fegato fetale e, in misura inferiore, milza e timo). Hanno evidenziato i livelli di espressione più elevati nel fegato fetale, unico tessuto in cui il trascritto è risultato evidenziabile anche tramite northern blot.

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo progetto è la ricerca di fattori genetici di suscettibilità al *Lupus Eritematoso Sistemico* (LES). In particolare durante il mio primo anno di dottorato ho proseguito uno studio da me condotto negli anni precedenti, avente il fine di ricercare geni di suscettibilità al LES nella regione cromosomica candidata 1q32-1q43. Durante quest'anno ho approfondito l'analisi su uno dei geni mappanti in questa regione e che aveva precedentemente evidenziato un'associazione con il LES (*CRIL*). Con il mio lavoro mi sono proposta di confermare l'associazione osservata, sia analizzando gli stessi polimorfismi su altre casistiche indipendenti, sia analizzando altri marcatori nelle regioni centromeriche e telomeriche rispetto a *CRIL*.

MATERIALI E METODI

Campioni utilizzati: I campioni utilizzati per questo studio includono in totale 461 pazienti provenienti da numerosi centri clinici di raccolta distribuiti in tutta Italia. I campioni di controllo (in totale 519) sono individui apparentemente sani, provenienti da vari centri trasfusionali o di ricerca italiani. I pazienti ed i controlli utilizzati per questo studio sono concordi per età, sesso, provenienza geografica ed appartengono tutti alla popolazione italiana. Sono stati esclusi dall'analisi i pazienti ed i controlli di origine sarda. Inoltre è stata utilizzata una casistica di pazienti (671) e di controlli (678) Spagnoli, provenienti dalla regione delle Asturie, da Madrid, da Granada e da Malaga. La diagnosi di LES è stata effettuata in base ai criteri ARA revisionati, e tutti i pazienti corrispondono ai requisiti minimi per la diagnosi di LES. Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato per l'utilizzo del proprio materiale biologico ai fini di ricerca. I campioni sono stati ottenuti sia sotto forma di prelievo ematico direttamente dal centro diagnostico, sia, tramite la collaborazione con altri gruppi di ricerca italiani ed esteri, come DNA già purificato.

Tipizzazione degli SNPs: Tutti i polimorfismi sono stati analizzati con la metodica SNaPshot. Per ogni polimorfismo sono state messe a punto condizioni di amplificazione specifiche in singolo o in multiplex che escludono tutte le altre sequenze omologhe e condizioni di SNaPshot in multiplex. Data l'elevata omologia tra le sequenze da amplificare e le regioni vicine i primers di PCR specifici sono stati disegnati sfruttando i pochissimi punti in cui la sequenza da amplificare e quelle omologhe, allineate con il programma BLAST, presentano poche basi non appaiate. La sequenza dei primers utilizzati, le condizioni di amplificazione, e quelle utilizzate per lo SNaPshot sono disponibili su richiesta.

Studio dell'espressione di CRIL: L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit RNeasy della ditta Ambion (Austin, TX) da cellule congelate di linfociti di sangue periferico, ottenuti tramite separazione su gradiente di densità, attivati e precedentemente posti in coltura, da linfociti non attivati o da cellule congelate di midollo osseo (materiale fornito dal laboratorio di ematologia). Il cDNA è stato retrotrascritto utilizzando il kit ThermoScript™ RT+PCR Systems (Invitrogen).

I primers specifici sono stati disegnati sfruttando i punti di non omologia tra le sequenze di cDNA di *CR1* e *CRIL* grazie al programma ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Sono stati seguiti tre differenti protocolli per i tre diversi frammenti amplificati.

-CRIL isoforma 1 L'amplificazione del messaggero è stata ottenuta attraverso due PCR successive: una prima amplificazione che genera un frammento di 918 basi seguita da una seconda PCR che utilizza un primer antisenso interno al frammento precedentemente amplificato e lo stesso primer forward utilizzato nel primo passaggio (SCR5 sense cDNAF).

SCR5 sense (cDNAF) = TTT GGC ATG AAA GGG CCC TC

Cr1L cDNA ex12-13 R = TTA AAA TAA AGA TGA TCG TAC CAA G

CR1L rna ex4 R=GTG GCT GAC ATA CCC TGG AG

La prima PCR è stata eseguita in un volume totale di 20 ml, utilizzando 2 ml di cDNA, 8.0 pmol di ciascun primer, 4.0 pmol di dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 0,75 U di Taq Polimerasi (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems) e 1X buffer II (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl alla concentrazione finale). L'amplificazione è avvenuta in un termociclatore di tipo Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems), seguendo il protocollo touch-down. Alla fase iniziale di denaturazione /attivazione della Taq sono seguiti 20 cicli in cui la temperatura di appaiamento dei primers è stata abbassata gradualmente da 65°C a 55°C, e 33 cicli ad una temperatura di 55°C. In tutti i cicli le fasi di appaiamento ed estensione avevano una durata di 30 secondi.

2 ml di amplificato sono stati utilizzati per la PCR emi-nested. Sono stati utilizzati 2 ml di cDNA, 8.0 pmol di ciascun primer, 4.0 pmol di dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 0,75 U di Taq Polimerasi (AB Analitica) e 1X buffer (16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM TrisHCl pH 8.8, 0.01% Tween 20 alla concentrazione finale). Si è utilizzato un protocollo di amplificazione simile a quello adoperato per la prima PCR, ma sono stati eseguiti solo 25 cicli alla temperatura più bassa (55°C).

-CRIL isoforma 2 Il trascritto, di 636 basi, è stato amplificato con i primers specifici:

CR1L-2 CDNA F-SP = CAC TAA CCG GAC TCA GAA GGG ACT T

CR1L-2 CDNA R-branch = CCG GTT AAG ATT TTT ATT ATT CCA GAG

L'amplificazione è stata effettuata in un volume totale di 20 ml, utilizzando 2 ml di cDNA, 10.0 pmol di ciascun primer, 10.0 pmol di dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 0,75 U di Taq Polimerasi (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems) e 1X buffer II (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl alla concentrazione finale). L'amplificazione è avvenuta in un termociclatore di tipo Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems). 10 minuti iniziali di denaturazione/attivazione dell'enzima sono stati seguiti da 35 cicli di denaturazione (96°C-30"), appaiamento dei primers (52°C-45") ed estensione (72°C-1'30") e dalla fase di estensione finale (72°C-10').

-*CR1/CR1L* I primers sono stati scelti in modo da coamplificare indifferentemente sia *CR1* che *CR1L*

CR1L rna ex4 F= CCT CCA AAT GTG GAA AAT GG

CR1L rna ex4 R= GTG GCT GAC ATA CCC TGG AG

Per la reazione (20 ml di volume finale) sono stati utilizzati 2.0 ml di cDNA, 8.0 pmol di ciascun primer, 4.0 pmol di dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 0,75 U di Taq Polimerasi (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems) e 1X buffer II (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl alla concentrazione finale). L'amplificazione è avvenuta in un termociclatore di tipo Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems), seguendo il protocollo touch-down.

RISULTATI

PREMESSE

Durante gli anni precedenti in questo stesso laboratorio ho personalmente condotto uno studio di associazione sistematico sulla regione cromosomica 1q32-q43, che da precedenti studi di linkage condotti da diversi gruppi su popolazioni diverse (Johanneson et al. 2001; Graham et al. 2001; Tsao et al. 1999; Johanneson et al. 2004), ed in base a convergenti evidenze su modelli murini (Shirai et al. 2002), era risultata quella più fortemente candidata a contenere uno o più geni coinvolti nella patogenesi del LES. Nel corso di questo studio erano stati analizzati tutti i geni compresi in questa regione, indipendentemente dalla loro rilevanza funzionale. A questo scopo erano stati utilizzati marcatori di tipo htSNPs (haplotype tag SNPs), selezionati tra quelli genotipizzati dal progetto HapMap. Il progetto HapMap è stato lanciato nel 2002, con lo scopo di creare una banca dati pubblica di variazioni comuni di tipo SNP di tutto il genoma umano per facilitare gli studi genetici. Al momento comprende più di un milione di SNPs, scelti da altre banche dati in modo da essere uniformemente distribuiti nel genoma, approssimativamente uno ogni 5 kb. La maggior parte dei marcatori disponibili sul sito dell'HapMap sono quindi localizzati in regioni introniche o intergeniche. Per ciascun marcatore viene riportata la genotipizzazione completa in 269 campioni provenienti da diverse popolazioni ed informazioni sul linkage disequilibrium con altri SNPs. (The International HapMap Consortium 2005).

Per ogni gene i dati di tipizzazione resi disponibili dal progetto HapMap erano stati analizzati con il software HaploView, per identificare i blocchi di linkage disequilibrium ed i tag SNPs, cioè i polimorfismi che dovrebbero essere testati per effettuare un'analisi completa del gene. Infatti in base alle osservazioni effettuate fino ad ora si ritiene che aplotipi comuni comprendano la maggior parte delle varianti di sequenza all'interno di regioni di dimensioni variabili, determinabili dall'analisi del Linkage disequilibrium, e che questi aplotipi ed i polimorfismi ignoti che potrebbero esservi contenuti, possono essere analizzati con un piccolo numero di "Tag SNPs". Dati recenti suggeriscono che la maggior parte del genoma umano sia contenuto in blocchi aplotipici di dimensioni considerevoli. Questi dati dimostrano che per la maggior parte degli alleli comuni non è necessario scoprire e testare ogni polimorfismo individualmente, ma che una mappa degli aplotipi ed i tag SNPs opportunamente selezionati possono fornire le stesse informazioni con solo una piccola perdita di potere statistico (Gabriel et al. 2002).

I tagSNPs così selezionati erano stati analizzati confrontando per ogni marcatore la frequenza allelica misurata in un pool di DNA di pazienti con quella misurata in un pool di DNA di controlli tramite primer extension e high performance liquid chromatography. Erano state utilizzate due coppie di pools, comprendenti in totale 410 pazienti e 600 controlli, concordi tra loro per sesso e provenienza geografica. Questa metodica ci ha consentito l'analisi in tempi rapidi di molte variazioni, ed è stato utilizzato come sistema di screening. I marcatori che avevano evidenziato una differenza statisticamente significativa tra le frequenze alleliche misurate nei pazienti e quelle misurate nei controlli erano stati confermati con uno studio classico di tipo caso-controllo tramite tipizzazione di singoli campioni di pazienti LES e controlli sani, su una casistica almeno parzialmente indipendente dalla prima. Complessivamente erano stati analizzati 219 polimorfismi in 74 geni. L'associazione più significativa era stata osservata a carico dell'elemento genico *CRIL* (*CRI-like*): ben tre marcatori intronici (rs2796239, rs6667500, rs2761424) avevano evidenziato una differenza significativa tra le frequenze alleliche dei pazienti e quelle dei controlli in almeno una coppia di pools e nella popolazione complessiva (rispettivamente $p = 0,0001531$, $p = 0,0019393$, $p = 0,000364$). Questo gene era stato quindi analizzato in modo molto approfondito.

L'intera sequenza codificante delle tre ipotetiche isoforme di *CRIL*, le regioni 5'UTR e 3'UTR, i confini esone/introne e 870 basi nella sequenza 5' flanking del gene erano state analizzate con DHPLC e sequenziamento per la ricerca di polimorfismi in 31 pazienti italiani affetti da LES. Complessivamente erano state osservate 24 variazioni (tabella 1): 4 inserzioni/delezioni che includono una delezione di 9 basi nel secondo introne, una delezione di tre basi (AGA), nel nono introne, e due inserzioni/delezioni nel promotore (9T/8T) e nel terzo esone (9A/10A), e 20 sostituzioni di una base. Gli SNP osservati includono 6 polimorfismi nella sequenza 5' flanking, 5 polimorfismi nella sequenza codificante, tra cui 4 variazioni aminoacidiche (Gly116Arg, Val139Ile, Asp402Asn, Arg410Cys) ed una variazione sinonima (Asn81Asn), 4 polimorfismi nel 3' UTR e 5 polimorfismi intronici situati in sequenze non coinvolte nello splicing. 12 delle varianti osservate sono state descritte per la prima volta, le altre sono riportate nella banca dati dell'ncbi.

Avevamo analizzato i polimorfismi della tabella 1, oltre ai tag SNPs di *CRIL* selezionati dalle banche dati e precedentemente analizzati su pool, per un totale di 25 marcatori, su di un primo pannello di 180-240 pazienti LES e 185-234 controlli sani appartenenti alla popolazione italiana. Questo primo screening aveva lo scopo di effettuare una prima stima dell'associazione con la malattia su tutti i marcatori e di selezionare un pannello più ristretto di variazioni da analizzare su una casistica più ampia di pazienti e di controlli.

Quattro marcatori (3'UTR +317 C/T, Arg410Cys, IVS2 9bp-del, -185 G/C) avevano evidenziato una frequenza $\leq 0,01$ sia nei pazienti che nei controlli, per cui non erano stati ulteriormente analizzati. Tre di questi polimorfismi (Arg410Cys, IVS2 9bp-del, -185 G/C) erano stati osservati in un solo paziente su 200 ed in nessun controllo sano.

Cinque marcatori (3'UTR +41 T/C, 3'UTR +137 T/C, rs2796239, rs6667500 e rs2761424) avevano evidenziato un'associazione con il LES in questa casistica. Inoltre, il dato osservato su un polimorfismo relativamente raro nella regione 3'UTR di *CRIL* (3'UTR+163 G/A), che si presenta con una frequenza dello 0,01 nei pazienti e dello 0,03 nei controlli, si avvicina alla significatività statistica.

LAVORO SVOLTO DURANTE IL PRIMO ANNO DI DOTTORATO

Nel corso del mio primo anno di dottorato i polimorfismi 3'UTR +41 T/C, 3'UTR +137 T/C, 3'UTR+163 G/A, rs2796239, rs6667500 e rs2761424 sono stati tipizzati su una seconda casistica (203 pazienti LES e 203 controlli, per un totale, considerando entrambe le casistiche, di 378 pazienti e 383 controlli appartenenti alla popolazione italiana). Inoltre i polimorfismi 3'UTR +137 T/C, rs2796239, rs6667500 e rs2761424 sono stati analizzati anche su una seconda popolazione indipendente (671 pazienti affetti da LES e 678 controlli sani di nazionalità spagnola). Il polimorfismo 3'UTR +41 T/C è risultato in LD assoluto con lo SNP rs2761424 sia nella popolazione italiana ($D'=1$; $r^2=0,98$), sia in un primo campione di 230 LES e 259 controlli sani della popolazione spagnola, per cui non è stato ulteriormente analizzato.

ASSOCIAZIONE CON LA SUSCETTIBILITA' AL LES

Cinque polimorfismi (3'UTR +41, 3'UTR +137, rs2796239, rs6667500 e rs2761424), tutti situati all'interno del gene *CRIL* avevano evidenziato un'associazione con il LES nella prima casistica (tabella 2). Per tutti e 5 i polimorfismi l'allele più raro è sovrarappresentato nella popolazione sana, il che farebbe pensare ad un effetto protettivo: 3'UTR +41 (OR=0,63; 95% CI=0,46-0,86 $p=0,00318$), 3'UTR +137 (OR=0,72; 95% CI=0,55-0,95 $p=0,01777$), rs2761424 (OR=0,62; 95% CI=0,45-0,84 $p=0,00213$), rs6667500 (OR=0,65; 95% CI=0,49-0,85 $p=0,00155$), rs2796239 (OR=0,66; 95% CI=0,50-0,89 $p=0,00568$). Tre di queste varianti (rs2796239, rs6667500 e rs2761424) sono tag SNPs intronici, mentre le altre due sono SNPs della regione 3'UTR. Tra questi polimorfismi è stato osservato un forte grado di LD.

I marcatori 3'UTR +41, 3'UTR +137, rs2796239, rs6667500 e rs2761424 ed il polimorfismo 3'UTR+163 ($p=0,0758$), sono stati ulteriormente analizzati.

Nella seconda casistica di pazienti e controlli italiani solo i polimorfismi 3'UTR +41 (frequenza LES=0,23; frequenza controlli=0,30; $\chi^2=4,02$; $p=0,0450$; OR=0,71; 95% CI=0,51-0,99) e rs2761424 (frequenza LES=0,23; frequenza controlli=0,30; $\chi^2=5,50$; $p=0,0191$; OR=0,68; 95% CI=0,49-0,94) mostrano un'associazione significativa. Se si considera la casistica italiana totale (casistica 1 + casistica 2), tutti e cinque i polimorfismi che presentavano una differenza significativa tra le frequenze alleliche di LES e controlli sani nella prima casistica confermano tale significatività (vedi tab. 3). Il polimorfismo 3'UTR+163 presentava una lieve differenza non significativa nella popolazione originaria, che però scompare del tutto nella seconda casistica. L'associazione più significativa sulla casistica totale è stata osservata per i 2 polimorfismi tra loro in LD quasi assoluto 3'UTR+41 e rs2761424 ($\chi^2=12,9$; $p=0,0003$; OR=0,65; 95% CI=0,51-0,82).

Non è stata osservata alcuna differenza di frequenza statisticamente significativa sulla popolazione spagnola (vedi tab. 4). Se si effettua una meta-analisi tra le popolazioni italiana (casistica complessiva) e spagnola, osservo ancora un'associazione significativa per tre polimorfismi: 3'UTR +41 ($\chi^2=9,73$; $p=0,001817$; OR=0,76, 95% CI=0,63-0,90), rs2761424 ($\chi^2=9,81$; $p=0,001739$; OR=0,80, 95% CI=0,70-0,92) ed rs6667500 ($\chi^2=7,39$; $p=0,006556$; OR=0,85, 95% CI=0,75-0,96).

Le frequenze genotipiche nella popolazione italiana per i 5 polimorfismi significativamente associati con il LES sono riportate nella tabella 5. Per gli SNPs 3'UTR+41, 3'UTR+137, rs2761424, rs6667500, rs2796239 la distribuzione dei genotipi differisce significativamente tra pazienti e controlli. Inoltre dall'analisi delle distribuzioni genotipiche per tutti e 5 i polimorfismi sembra emergere un ruolo protettivo per l'allele più raro che è sempre sovrarappresentato in omozigosi nei controlli. Per i due polimorfismi in LD assoluto 3'UTR+41 e rs2761424 l'effetto è probabilmente dominante, poiché si nota nei controlli un aumento delle frequenze genotipiche contenenti l'allele che si suppone protettivo sia in omozigosi che in eterozigosi. Anche nel caso delle frequenze genotipiche, nella popolazione spagnola non si osserva alcuna associazione significativa (dati non presentati).

A causa del LD i 6 SNPs analizzati sulla casistica più estesa generano solo 5 aplotipi, due dei quali presentano una frequenza inferiore al 5% sia nei pazienti che nei controlli (Tab. 8). La frequenza dei due aplotipi più comuni nella popolazione italiana differisce significativamente tra pazienti e controlli. In particolare l'aplotipo contenente tutti gli alleli singolarmente più frequenti nei controlli sani presenta una frequenza significativamente più elevata nella popolazione di controllo ($p=0,00036$; OR=0,65; 95% CI=0,51-0,82). Tuttavia la significatività

dell'associazione osservata con l'aplotipo non differisce da quella osservata con i singoli polimorfismi in LD assoluto 3'UTR+41 e rs2761424. L'allele T del polimorfismo rs2761424 è l'unico allele protettivo presente solo nell'aplotipo protettivo. Gli alleli più rari degli altri polimorfismi associati, invece, pur presentando singolarmente un effetto protettivo, compaiono anche in aplotipi "di rischio" (più frequenti nei pazienti). Questo dato farebbe pensare che l'associazione osservata sia dovuta esclusivamente all'effetto del polimorfismo rs2761424, non ad una particolare combinazione aplotipica. Per confermare tale ipotesi è stata valutata la distribuzione delle frequenze alleliche e genotipiche dei polimorfismi rs2796239, 3'UTR+137 e rs6667500 nel sottocampione di individui "T-negativi" per il polimorfismo rs2761424. Non si osserva alcuna differenza statisticamente significativa né a carico delle frequenze alleliche (tabella 7) né a carico di quelle genotipiche (tabella 6). In base a questi dati il polimorfismo rs2761424, in LD assoluto con lo SNP 3'UTR+41, sembrerebbe quello primariamente associato con la suscettibilità al LES.

Non si osserva alcuna differenza significativa nella distribuzione aplotipica tra pazienti e controlli spagnoli (tabella 8B).

Il dato di associazione con *CRIL* appare non del tutto convincente, infatti, nonostante alcuni dati lo suggeriscano (Logar et al. 2002, Irshaid et al. dati non pubblicati), non ci sono prove che *CRIL* sia effettivamente un gene funzionale. Centromericamente rispetto a *CRIL* mappa il gene strutturalmente e sequenzialmente omologo *CRI* (complement component (3b/4b) receptor 1), da cui probabilmente *CRIL* è filogeneticamente derivato in seguito a fenomeni di crossing-over disuguale. In posizione telomerica rispetto a *CRIL* mappa il gene *MCP* (*CD 46*). Sia *CRI* che *MCP* sembrano funzionalmente correlati con il LES, in quanto la loro espressione correla con l'attività della malattia, tuttavia si ritiene che queste alterazioni siano secondarie allo sviluppo della patologia e non determinate geneticamente.

E' stato analizzato il linkage disequilibrium (LD) tra i tre geni utilizzando tutti i polimorfismi genotipizzati dal progetto HapMap su famiglie CEPH compresi tra il 5' del gene *CRI* ed il 3' del gene *MCP* (321 SNPs, compresi in una regione di 301 Kb). Per l'elaborazione statistica e grafica è stato adoperato il software Haploview. La predizione è stata effettuata utilizzando le famiglie CEPH. I blocchi di LD sono stati definiti tramite la definizione di blocco aplotipico di Gabriel (2002). Questo metodo distingue nella regione analizzata 9 blocchi di LD, i primi 5 compresi nel gene *CRI*, 3 compresi nel gene *CRIL*, mentre il nono contiene l'intero gene *MCP*. Tra i geni *CRI* e *CRIL* sembra esserci un hot spot di ricombinazione, e lo stesso accade all'interno del gene *CRIL*. Tra i polimorfismi di *CRIL* ed i marcatori del gene *MCP* (situati in

due blocchi diversi), si osserva tuttavia un certo grado di LD ($0,91 < D' < 0,67$). I polimorfismi di *CRIL* significativamente associati con la malattia ricadono nel terzo blocco aplo-tipico di questo gene, e sono pertanto in LD con *MCP*.

Tra i 5 tagSNP di *MCP* analizzati su pools solo uno (rs2724377) aveva presentato una differenza debolmente significativa solo nella popolazione complessiva, ma il dato non raggiungeva la significatività nelle due coppie di pools esaminate separatamente. Questo dato potrebbe quindi riflettere un linkage disequilibrium con la più forte associazione osservata per i polimorfismi di *CRIL*. Al contrario, nessun polimorfismo del gene *CRI* era risultato statisticamente associato al LES nelle due coppie di pools esaminate, e questo dato, unito a quelli di LD predetti sulla base dei genotipi osservati in 30 famiglie CEPH, porterebbe ad escludere che l'associazione riscontrata a carico del gene *CRIL* possa riflettere un LD con il gene *CRI*.

Per escludere che l'associazione osservata rifletta quella più forte con un altro polimorfismo in linkage disequilibrium con l'rs2761424 di *CRIL* abbiamo tipizzato, in 181-240 pazienti italiani affetti da LES ed in 198-215 controlli sani appartenenti alla popolazione italiana, 5 tagSNPs nel gene *CRI* e 9 tagSNPs situati nella regione telomerica rispetto a *CRIL*, 4 dei quali contenuti nel gene *MCP* uno intergenico, gli altri in posizione ancora più telomerica (2 nel gene *CD34*, uno nell'elemento genico *LOC148696* e 1 intergenico). In questa sottocasistica le frequenze alleliche dei polimorfismi associati continuano a presentare una differenza significativa tra pazienti e controlli: rs2796239 ($\chi^2=5,41$; $p=0,0201$; OR=0,70; 95% CI=0,52-0,95), rs2761424 ($\chi^2=6,51$; $p=0,0107$; OR=0,65; 95% CI=0,46-0,91), ex10+137 ($\chi^2=4,94$; $p=0,0262$; OR=0,72; 95% CI=0,54-0,96), rs6667500 ($\chi^2=8,15$; $p=0,0043$; OR=0,66; 95% CI=0,49-0,88) (tabella 9). Pertanto il potere statistico dell'analisi è sufficiente per evidenziare almeno un effetto grande quanto quello osservato a carico di questi SNPs.

Non è stata osservata un'associazione significativa con nessuno dei 13 nuovi tagSNPs analizzati (tabella 9). I polimorfismi sono stati successivamente analizzati uno per uno in combinazione aplo-tipica con il polimorfismo primariamente associato rs2761424. Da questa analisi si è notata un'associazione a carico di 2 aplotipi, contenenti, oltre al polimorfismo rs2761424, rispettivamente lo SNP rs926631 ($\chi^2=7,87$; $p=0,0050$; OR=1,48, 95% CI=1,11-1,98) e lo SNP rs2761437 ($\chi^2=8,62$; $p=0,0033$; OR=1,59, 95% CI=1,15-2,19), situati rispettivamente in posizione intergenica e nel gene *MCP*. Stranamente però non si osserva un aumento nei controlli dell'aplotipo contenente l'allele T protettivo dell' rs2761424 di *CRIL*,

ma l'associazione osservata è in entrambi i casi a carico di un aplotipo che contiene l'allele C del suddetto polimorfismo, che presenta una frequenza più elevata nei pazienti sia in singolo che in combinazione aplotipica. Si osserva un dato simile di associazione anche a carico di un aplotipo che comprende i tre polimorfismi ($\chi^2=9,31$; $p=0,0023$; $OR=1,53$, 95% $CI=1,15-2,04$) (tabelle 10).

I due polimorfismi rs926631 ed rs2761437 sono stati testati anche su una sottocasistica della popolazione spagnola (415 pazienti ed 400 controlli). Il dato non si è però riconfermato in questa popolazione (dati non presentati).

LINKAGE DISEQUILIBRIUM NEI GENI *CRI* E *CRIL*

I dati di genotipizzazione di tutti i polimorfismi per le popolazioni italiana sono stati analizzati con il software Haploview per determinare i valori di LD (D' ed r^2) e la distribuzione dei blocchi aplotipici sulla nostra popolazione. Rispetto ai dati predetti sulle famiglie CEPH del progetto HapMap, sul nostro campione si osserva LD tra i polimorfismi di *CRI* e quelli della porzione più 5'-terminale di *CRIL*. Tuttavia non si osserva LD tra i polimorfismi situati nel 3'UTR di *CRIL* (che hanno evidenziato un'associazione significativa sulla prima casistica) e gli altri SNPs di *CRIL* e *CRI*. Questo dato conferma la predizione effettuata sulle genotipizzazioni di HapMap. I polimorfismi della porzione 3' terminale di *CRIL* sono caratterizzati da un forte grado di LD.

I polimorfismi telomerici rispetto a *CRIL* mostrano un certo grado di LD anche nella nostra popolazione, e questo dato conferma quello predetto utilizzando i polimorfismi tipizzati sulle famiglie CEPH dal progetto Hapmap.

STUDI DI ESPRESSIONE SU *CRIL*

Al momento la banca dati ncbi.nlm.nih.gov sono riportate tre diverse isoforme di RNA di *CRIL* (XM_931256, XM_931252 e XM_114735). Si tratta di isoforme ipotetiche basate su dati in silico, ma alcune di queste hanno trovato una conferma da dati sperimentali. Logar et al. sono stati gli unici per il momento ad aver evidenziato l'mRNA dell'isoforma XM_114735 (isoforma 1), da cellule ematopoietiche e da tessuto linfoide fetale utilizzando primers specifici per la porzioni 3'UTR e per l'SCR1 di *CRI*. Questa isoforma è la prima ad essere stata riportata su banche dati, corrisponde al trascritto più lungo (1826 basi), contiene 14 esoni e codifica per i 7 SCR di *CRIL*. L'isoforma XM_931256 (isoforma 2) è stata evidenziata nel midollo osseo e nel tessuto linfoide fetale ed interamente sequenziata da Irshaid et al. (dati non pubblicati) e deriva da un evento di poliadenilazione alternativa. Al momento abbiamo

studiato l'espressione dell'isoforma 1 e dell'isoforma 2. L'isoforma XM_931252 (isoforma 3) è stata segnalata solo più recentemente, pertanto la sua espressione deve ancora essere indagata. Quest'ultima è costituita solo dai primi quattro esoni del gene, più le prime 74 basi del quarto introne, e codifica solo per i primi due SCR.

Abbiamo valutato l'espressione di *CRIL* con la tecnica RT-PCR su tre diversi tessuti: linfociti attivati e posti in coltura, linfociti non attivati e midollo osseo. Tutti i tipi cellulari provenivano da umani adulti non affetti da patologie riconosciute. In ogni esperimento è stato amplificato sempre almeno un campione di DNA genomico, per escludere la possibilità di un risultato falsamente positivo dovuto all'amplificazione aspecifica di sequenze di DNA genomico che potrebbero contaminare il campione di RNA.

Per l'amplificazione dell'isoforma 1 abbiamo deciso di non seguire il protocollo adottato da Logar et al, poiché i primers da essi utilizzati non sono specifici per *CRIL*, ma possono amplificare anche sequenze del gene *CRI*. L'isoforma 1 è stata amplificata in due tempi:

1) con una prima RT-PCR "long-transcript" per la quale sono stati usati un primer senso specifico per l'SCR 5 di *CRIL*, sul quinto esone, (SCR5 sense cDNA F) ed un primer antisenso specifico per la porzione 3'UTR (*CRIL* cDNA ex12-13 R), che amplificano su cDNA un frammento di 918 basi corrispondente alla porzione di gene (dall'esone cinque alla porzione 3' terminale) che non è trascritta nelle altre due isoforme putative. Sono state tentate due differenti condizioni di amplificazione. Non è stata evidenziata alcuna trascrizione a questo livello, con nessuna condizione di PCR, in nessuno dei tre tipi cellulari utilizzati (dati non mostrati).

2) L'RT-PCR "long-transcript" è stata riamplicata tramite una PCR "emi-nested" per la quale sono stati utilizzati lo stesso primer SCR5 sense, ed un primer antisenso interno alla sequenza amplificata dalla prima coppia di primers, che si allinea sulla sequenza del messaggero di *CRIL* in corrispondenza della giunzione tra quinto e sesto esone (*CRIL* rna ex4 R). Questi primer amplificano una sequenza molto più corta, di 91bp, ugualmente specifica per l'isoforma 1. La sequenza completa dell'isoforma 1 come è stata riportata da Logar et al. (2004), ed i primer utilizzati per il nostro studio sono riportati nella fig. 4.

Con la seconda amplificazione (figura 5) abbiamo ottenuto una intensa banda di peso molecolare corrispondente a quello atteso (91bp). Nelle linee corrispondenti ai tre campioni di DNA genomico utilizzati come controllo non si osserva questo prodotto, ma solo bande probabilmente aspecifiche. Tramite sequenziamento, è stata confermata l'identificazione del

prodotto amplificato e ci si è accertati che non si trattasse di un prodotto causato dall'appaiamento aspecifico dei primers con sequenze codificanti del gene *CR1*, espresso in quantità nettamente superiore.

Il dato ottenuto dopo la PCR emested è compatibile con livelli molto bassi o basali di trascrizione dell'isoforma più lunga di *CRIL* nei linfociti. Da questo esperimento non è possibile quantificare il trascritto. Inoltre occorrerebbe verificare se avviene la traduzione a proteina.

E' stato effettuato anche un esperimento utilizzando primers, in grado di amplificare indistintamente sia l'esone 4 di *CRIL* che l'esone 4 di *CR1*. Il prodotto ottenuto (181bp) è stato sequenziato. Nonostante l'elevata omologia tra i due geni sarebbe stato possibile in questo modo sequenziare entrambi i prodotti (*CR1* e *CRIL*) e distinguere il contributo apportato dall'uno o dall'altro gene concentrandosi sui punti in cui le sequenze dei due geni differiscono, che, qualora i due geni fossero espressi in quantità stechiometricamente paragonabile, sarebbero evidenti nel sequenziamento. Nell'esperimento effettuato solo il contributo apportato da *CR1* era evidenziabile, il che rafforza la tesi che l'isoforma 1 di *CRIL* sia trascritta solo a livelli molto bassi.

Per indagare sull'eventuale espressione dell'isoforma 2 è stata effettuata una RT-PCR utilizzando un primer antisenso specifico per l'isoforma 2 complementare alla sequenza consenso di poliadenilazione alternativa di questa isoforma ed ed un primer senso specifico per il primo esone (5' UTR) di *CRIL*. Il frammento amplificato è lungo 636 bp e contiene i primi 4 esoni di *CRIL*. Sono stati utilizzati due cDNA di midollo osseo di individui diversi, un cDNA di linfociti non attivati e due cDNA provenienti da linfociti attivati con PHA e posti in coltura di due diversi individui. In entrambi i campioni di midollo osseo si osserva una banda molto netta con un peso molecolare compatibile con quello del frammento cercato. Una banda di ugual peso molecolare ma molto più debole è presente anche in corrispondenza del cDNA di linfociti non attivati (figura 6). La banda non è visibile in corrispondenza del campione di DNA genomico co-amplificato come controllo, per cui si esclude che l'amplificato ottenuto possa essere dovuto ad una contaminazione da DNA genomico. Non è stata osservato alcun segno di amplificazione per il cDNA di linfociti attivati (immagine non inclusa).

DISCUSSIONE

Durante il primo anno di dottorato ho completato un progetto seguito da me negli anni precedenti in questo stesso laboratorio, con il quale ci si era proposti di ricercare fattori genetici di suscettibilità al Lupus Eritematoso Sistemico (LES) nella regione cromosomica candidata 1q32-q43. Si era deciso di analizzare in modo approfondito questa regione perché era risultata associata al LES in più di uno studio di linkage su tutto il genoma (Whole Genome Linkage Studies – WGLS) precedentemente condotti da altri gruppi di ricerca.

L'associazione più evidente è stata osservata con l'elemento genico *CRIL* (complement component receptor 1-like), che mappa all'interno del cluster RCA. Infatti ben tre polimorfismi, tutti intronici, sono risultati significativamente associati alla malattia. Di conseguenza il gene *CRIL* è stato analizzato più approfonditamente, dapprima ricercando variazioni nucleotidiche nelle sue sequenze codificanti e regolatorie. Tutti i polimorfismi osservati sono quindi stati analizzati tramite uno studio caso-controllo su una prima casistica appartenente alla popolazione italiana.

Durante questo primo anno di dottorato ho esteso la casistica italiana di pazienti LES e di controlli per 6 polimorfismi selezionati tra quelli analizzati precedentemente perché avevano evidenziato una differenza statisticamente significativa nelle frequenze alleliche osservate nei pazienti e quelle riscontrate nei controlli nel primo gruppo esaminato. Inoltre ho tipizzato gli stessi SNPs su una casistica di pazienti e controlli appartenenti alla popolazione spagnola, ed ho analizzato altri SNPs nelle regioni centromeriche e telomeriche a *CRIL*.

E' stata osservata un'associazione statisticamente significativa, nella popolazione italiana, con cinque polimorfismi in stretto LD tra loro mappanti nella porzione 3'-terminale del gene.

Tra questi il marcatore che sembra primariamente associato è una variazione nucleotidica nella porzione 3'UTR dell'isoforma lunga di *CRIL*. In particolare l'allele più raro di questo SNP sembra essere protettivo contro il rischio di sviluppare il LES. L'associazione osservata nella popolazione italiana non si è però riconfermata in quella spagnola. Ciò può essere dovuto a differenze tra le popolazioni esaminate, ad errori di campionamento, o al fatto che le variazioni esaminate non hanno un effetto causale ma sono semplicemente in LD con la variazione determinante (e a differenze di LD tra la popolazione spagnola e quella italiana). In futuro intendiamo testare questi polimorfismi su altre popolazioni non correlate con quella italiana.

Inoltre sono state riscontrate tre variazioni rare, osservate solo in un paziente ed in nessun controllo (Arg410Cys, IVS2 9bp-del, -185 G/C). Tra queste la variante Arg410Cys è la più

interessante. Infatti la struttura tridimensionale delle proteine del cluster RCA è determinata da una serie di ponti disolfuro tra cisteine altamente conservate. E' ipotizzabile che l'introduzione di una nuova cisterna possa indurre la formazione di un ponte disolfuro in posizione scorretta distruggendo l'attività della proteina. Recentemente Birmingham et al. (2007) hanno osservato un polimorfismo Arg438Cys nel dominio di legame per C3b/C4b del gene *CR1* che inibisce l'attività di legame. Tuttavia, in base all'analisi in silico, la sostituzione Arg410Cys da noi riscontrata in *CR1L* è ritenuta "tollerata". Al momento è quindi difficile formulare ipotesi sul possibile ruolo di questa variazione.

Il dato di associazione riscontrato appare quantomeno curioso poiché non è ancora stato completamente chiarito se *CR1L* sia uno pseudogene oppure un gene funzionalmente espresso.

CR1L presenta oltre il 90% di omologia con *CR1* (complement component receptor 1), una proteina regolatrice del complemento espressa da vari tipi cellulari ma principalmente sulla membrana degli eritrociti. E' un recettore multifunzionale, in grado di legare C4b, C3b, C3bi, C1q e MBL. Il suo ruolo principale è la rimozione degli immunocomplessi. Poiché la deposizione degli immunocomplessi è una delle principali cause del danno tessutale nel LES, e poiché il deficit congenito o acquisito di componenti della via classica di attivazione del complemento conferisce un rischio elevato di contrarre la patologia, *CR1* è da tempo ritenuto un buon candidato per la suscettibilità al LES. Questa considerazione parrebbe confermata anche dal fatto che i livelli eritrocitari di *CR1* (E-*CR1*) sono diminuiti nei pazienti LES. Numerosi studi volti ad individuare un'associazione genetica tra un polimorfismo responsabile della alta/bassa espressione di E-*CR1* ed il LES sono però falliti (meta-analisi effettuata da Nath et al. 2005). Ridotti livelli di espressione nei LES sono stati riscontrati anche per *CR2*, un'altra proteina del cluster RCA, e si osservano oscillazioni del livello di espressione correlati con lo stato della malattia sia per *CR1* che per *MCP*.

Per escludere l'eventualità che l'associazione osservata rifletta quella più forte con uno SNP in LD con quelli analizzati abbiamo tipizzato 14 tagSNPs situati nelle regioni centromeriche e telomeriche a *CR1L*, includenti i geni *CR1* ed *MCP*. Nessuno dei marcatori analizzati è risultato significativamente associato al LES, anche se due polimorfismi in posizione telomerica, situati rispettivamente nel gene *MCP* e nella porzione intergenica tra i geni *CR1L* ed *MCP*, contribuiscono a formare un aplotipo che amplifica l'effetto del polimorfismo del gene *CR1L* maggiormente associato al LES. Anche questa associazione non si riconferma però nella popolazione spagnola. Tra i marcatori telomerici rispetto a *CR1L* ed i polimorfismi situati nella porzione 3' terminale di *CR1L* si osserva un certo grado di LD, sia nella nostra

popolazione che nelle famiglie CEPH del progetto HapMap. Non si osserva LD tra i polimorfismi statisticamente associati di *CRIL* ed i tagSNP del gene *CR1*, né nella nostra casistica, né nelle famiglie CEPH tipizzate dal progetto HapMap. In base ai nostri dati, quindi, l'associazione osservata sembrerebbe effettivamente imputabile prevalentemente a polimorfismi situati nella regione 3' terminale di *CRIL* o nella regione ancora più telomerica contenente i geni *MCP* e *CD34*.

CRIL è normalmente espresso e funzionale sulle membrane eritrocitarie dei primati non umani. Logar et al. hanno trovato prove che l'isoforma più lunga di *CRIL* sia espressa nel tessuto linfoide fetale umano ed in quello ematopoietico umano adulto, ma a livelli molto più bassi rispetto a *CR1*. Non sono però riusciti ad evidenziare anche la proteina. I nostri dati hanno rilevato tracce del cDNA dell'isoforma maggiore di *CRIL* in linfociti umani attivati e posti in coltura. Questo dato potrebbe però essere dovuto semplicemente a livelli basali di trascrizione. Inoltre abbiamo trovato in quantità più significativa il cDNA corrispondente ad una isoforma di *CRIL* costituita solo dai primi 4 esoni e dovuta a poliadenilazione alternativa, amplificandolo da cDNA di midollo osseo e di linfociti periferici non attivati. In base ai nostri dati sembra quindi che almeno l'isoforma più corta, e, anche se a livelli molto bassi, l'isoforma a lunghezza completa, siano trascritte in *Homo Sapiens*. Per poter stabilire con sicurezza se la proteina *CRIL* viene effettivamente tradotta sarebbe necessario mettere a punto un Western blot oppure un test di tipo ELISA. Al momento questo non è stato fatto poiché non si dispone di un anticorpo specifico per *CRIL*. Questo fatto ci impedisce anche di indagare la presenza della proteina umana *CRIL* sulla membrana degli eritrociti, dove potrebbe essere espresso in quantità nettamente superiore.

Una volta risolto il dubbio sull'effettiva espressione di *CRIL* resta comunque da chiarire la sua funzionalità. *CR1* in *Homo Sapiens* è una proteina transmembranaria strutturata in ripetizioni in tandem di sequenze omologhe (SCR) organizzate nella sua isoforma più comune in 4 LHR (long homologous repeats) caratterizzate da elevata omologia. Ogni dominio LHR ha una sua attività di legame indipendente dagli altri (Tas et al. 1999, Krych et al. 1991, 1994 e 1998; Klickstein et al. 1988). Il gene *CRIL* è più corto, infatti è costituito da un solo dominio LHR e manca delle porzioni C-terminali contenenti il dominio trans-membrana. *CRIL* nei primati non umani è invece ancorato alla membrana tramite GPI, ed è perfettamente funzionale. La porzione C-terminale del *CRIL* umano il cui cDNA è stato amplificato da Logar et al. (isoforma 1) presenta differenze rispetto a quello degli altri primati, con l'introduzione di un codone di stop. La porzione C-terminale della proteina non esibisce una idrofobicità significativa o una sequenza consenso per il legame con GPI, per cui è plausibile

che, se espresso, CR1L sia una proteina secretoria (Logar et al. 2004). Va ricordato che oltre alle proteine con domini trans-membrana CR1 e CR2, il cluster RCA comprende anche proteine ancorate alla membrana tramite GPI e proteine sieriche. Inoltre è stata identificata una forma ricombinante sierica di CR1, funzionalmente attiva. Anche se probabilmente non è in grado di restare ancorato alla membrana cellulare CR1L può dunque essere comunque funzionale. Logar et al. osservano una sua attività di binding con C4b, anche se non con C3b, di una proteina purificata da un esperimento di trascrizione e traduzione in vitro. Ricordiamo che C3 rappresenta il crocevia di entrambe le vie del complemento, sia quella classica che quella alternativa, mentre C4 è coinvolto esclusivamente nella via classica. E' interessante considerare anche l'importanza cruciale che la via classica di attivazione del complemento riveste nella patogenesi del LES: infatti i deficit genetici delle sue componenti (C1q, C2, C4) causano una forte predisposizione al LES. Questi fatti ben noti possono indurre a speculazioni sul ruolo di *CR1L* nel controllo dell'attivazione della via classica del complemento, e, di conseguenza nella suscettibilità al LES. Inoltre il gene murino *Crry*, costituito da 5 SCR omologhi a quelli di *CR1* e pertanto strutturalmente simile al corto CR1L è funzionale. Non si comporta però come recettore per C3b o C4b, ma presenta un'attività che riassume quelle delle proteine umane DAF e MCP.

Per quanto riguarda le due isoforme più corte è stato osservato che l'isoforma 2 sembra contenere al C-terminale un dominio di ancoraggio con il GPI. Inoltre questa isoforma sembrerebbe possedere una specificità di legame per i frammenti C4c e C4d, derivati dal clivaggio di C4 e che normalmente svolgono il ruolo di opsonine (Irshaid, personal communication).

La regione 3'UTR è fortemente implicata nel controllo della regolazione dell'espressione genica perché controlla specificamente la stabilità, l'attività trascrizionale, e l'esporto fuori dal nucleo del messaggero. Variazioni di sequenza a carico delle porzioni 3'UTR possono influenzare alcune di queste funzioni ed essere mutazioni causali di malattie genetiche. E' ipotizzabile che il gene *CR1L* sia in grado, anche se in stretta misura, di vicariare parzialmente *CR1*, e che una sua aumentata espressione possa conferire una protezione contro la malattia. Per cercare conferme a questa ipotesi vorremmo quantificare e confrontare i livelli di espressione di *CR1L* in individui portatori dell'aplotipo protettivo contro i livelli di individui portatori dell'aplotipo di rischio. E' stata effettuata un'analisi in silico con il programma UTR Scan, ma nessuno dei polimorfismi di interesse situati nella regione 3'UTR ricade in sequenze di legame per fattori trascrizionali.

Vista l'importanza del complemento nella patogenesi del LES, riteniamo che possa essere interessante approfondire l'analisi sia genetica che funzionale su questo gene. CR1 e CR2 sono stati proposti come bersagli terapeutici nella cura di alcune patologie. Se l'importanza di CR1L dovesse confermarsi non sarebbe impossibile ipotizzare un suo ruolo futuro per la terapia del LES.

Tab 1 Variazioni di sequenza del gene *CRIL* trovate in 31 pazienti affetti da LES

Ref.	localizzazione	variazione
rs10863437, nostro studio	promotore	-846 C/T
rs9651101, nostro studio	promotore	-827 G/A
nostro studio	promotore	-742 9T/8T
nostro studio	promotore	-727 T/G
nostro studio	promotore	-338 G/C
nostro studio	promotore	-185 G/C
rs3738469, nostro studio	promotore	-36 G/A
rs1118237, nostro studio	introne 1	IVS1+44 A/G
nostro studio	esone 2	Asn81Asn C/T
nostro studio	introne 2	IVS2 +(16-25) 9 bp del
rs12729569, nostro studio	esone 8	Asp402Asn A/G
rs12748243, nostro studio	introne 9	IVS8+38 C/T
nostro studio	esone 8	Arg410Cys C/T
rs2796255, nostro studio	esone 10	3'utr +41 T/C
rs2796257, nostro studio	esone 11	3'utr +137 T/C
nostro studio	esone 11	3'utr +163 G/A
rs 3215758, nostro studio	introne 3	IVS3-46 9A/10A
rs2296158, nostro studio	esone 3	Gly116Arg A/G
rs2296159, nostro studio	introne 4	IVS3+118 G/A
nostro studio	introne 4	IVS3+164 G/A
rs12411037, nostro studio	introne 4	IVS4-59 T/C
rs3085, nostro studio	esone 4	Val139Ile C/T
nostro studio	esone 14	3'utr +317 C/T
nostro studio	introne 9	IVS9+(153-156) AGA/-

Tab 2 Frequenze alleliche ed analisi statistica degli SNPs di *CR1L*

polimorfismo	allele	LES		controlli		statistica
		N*	freq	N*	freq	
CR1L 3'UTR+41	G	225	0,20	232	0,29	X2= 8,70 p=0,00318 OR=0,63 95% CI= 0,46-0,86
CR1L rs2761424	T	236	0,20	233	0,29	X2= 9,44 p=0,002128 OR=0,62 95% CI= 0,45-0,84
CR1L 3'UTR+137	C	235	0,37	233	0,45	X2= 5,62 p=0,01777 OR=0,72 95% CI= 0,55-0,95
CR1L 3'UTR+163	A	235	0,01	234	0,03	p=0,0758
CR1L Val139Ile	G	241	0,14	235	0,12	NS
CR1L 3'UTR+317	T	237	0,01	234	0,00	NS
CR1L rs6667500	G	231	0,38	227	0,49	X2= 10,01 p=0,00155 OR=0,65 95% CI= 0,49-0,85
CR1L rs2796239	A	217	0,37	185	0,47	X2= 7,65 p=0,005678 OR=0,66 95% CI= 0,50-0,89
CR1L Gly116Arg	G	198	0,47	214	0,46	NS
CR1L IVS8+35	T	212	0,24	237	0,22	NS
CR1L Asp402Asn	G	212	0,24	237	0,22	NS
CR1L IVS1+44	T	230	0,35	227	0,35	NS
CR1L rs4844614	A	228	0,21	204	0,24	NS
CR1L -338	C	223	0,12	221	0,10	NS
CR1L -36	A	227	0,12	221	0,10	NS
CR1L IVS9 AGA/-	del	230	0,12	210	0,10	NS
CR1L rs10494884	A	240	0,37	197	0,36	NS
CR1L IVS4-59	C	233	0,37	197	0,34	NS
CR1L -846	C	180	0,34	183	0,33	NS
CR1L -827	A	210	0,51	221	0,47	NS
CR1L -727	C	187	0,07	184	0,05	NS
CR1L IVS3 +164	T	216	0,16	191	0,14	NS
CR1L IVS+118	T	214	0,36	188	0,33	NS
CR1L rs 1323722	T	239	0,35	210	0,34	NS
CR1L rs 1830762	T	237	0,37	203	0,32	NS

* numero di individui analizzati per ogni polimorfismo

Tab. 3 Associazione dei polimorfismi di *CRIL* nella popolazione italiana

SNP (allele)	CASISTICA 1					CASISTICA 2					TOTALE				
	frequenze (n camp)*		statistica			frequenze (n camp)*		statistica			frequenze (n camp)*		statistica		
	LES	CT	X2	p	OR (95% CI)	LES	CT	X2	p	OR	LES	CT	X2	p	OR (95% CI)
rs2796239 (A)	0,37 (217)	0,47 (185)	7,65	0,0057	0,66 (0,50-0,89)	0,40 (244)	0,42 (334)	NS	NS	NS	0,39 (461)	0,44 (519)	3,4	0,0652	0,82 (0,66-1,01)
3'UTR+41 (G)	0,20 (225)	0,29 (232)	8,70	0,0032	0,63 (0,46-0,86)	0,23 (191)	0,30 (190)	4,02	0,0450	0,71 (0,51-0,99)	0,21 (416)	0,30 (422)	12,7	0,0004	0,65 (0,51-0,83)
rs2761424 (T)	0,20 (236)	0,29 (233)	9,44	0,0021	0,62 (0,45-0,84)	0,23 (201)	0,30 (204)	5,50	0,0191	0,68 (0,49-0,94)	0,21 (437)	0,29 (437)	12,9	0,0003	0,65 (0,51-0,82)
3'UTR+137 (C)	0,37 (235)	0,45 (233)	5,62	0,0178	0,72 (0,55-0,95)	0,41 (202)	0,44 (203)	NS	NS	NS	0,38 (437)	0,44 (436)	5,12	0,0237	0,79 (0,64-0,97)
3'UTR+163 (A)	0,01 (235)	0,03 (234)	3,15	0,0758	NS	0,02 (203)	0,02 (203)	NS	NS	NS	0,02 (438)	0,03 (437)	0,96	0,3276	NS
rs6667500 (G)	0,38 (231)	0,49 (227)	10,0	0,0016	0,65 (0,49-0,85)	0,44 (202)	0,47 (203)	NS	NS	NS	0,41 (433)	0,48 (430)	7,14	0,0076	0,75 (0,61-0,93)

* frequenza dell'allele più raro (indicato tra parentesi nella colonna 1) e numero di campioni su cui il polimorfismo è stato analizzato

Tab. 4 Associazione dei polimorfismi di *CRIL* nella popolazione italiana ed in quella spagnola

SNP (allele)	ITALIANI					SPAGNOLI			ITALIANI + SPAGNOLI				
	frequenze (n camp)*		statistica			frequenze (n camp)*		statistica	frequenze (n camp)*		statistica		
	LES	CT	X2	p	OR (95% CI)	LES	CT		LES	CT	X2	p	OR
rs2796239 (A)	0,39 (461)	0,44 (519)	3,4	0,0652	0,82 (0,66-1,01)	0,43 (647)	0,43 (671)	NS	0,41 (1108)	0,43 (1190)	NS	NS	NS
3'UTR+41 (G)	0,21 (416)	0,30 (422)	12,7	0,0004	0,65 (0,51-0,83)	0,26 (230)	0,28 (259)	NS	0,23 (646)	0,29 (681)	9,73	0,001817	0,76 (0,63-0,90)
rs2761424 (T)	0,21 (437)	0,29 (437)	12,9	0,0003	0,65 (0,51-0,82)	0,25 (671)	0,27 (678)	NS	0,24 (1108)	0,28 (1115)	9,81	0,001739	0,80 (0,70-0,92)
3'UTR+137 (C)	0,38 (437)	0,44 (436)	5,12	0,0237	0,79 (0,64-0,97)	0,43 (660)	0,43 (666)	NS	0,41 (1097)	0,44 (1102)	3,00	0,083334	NS
3'UTR+163 (A)	0,02 (438)	0,03 (437)	0,96	0,3276	NS	0,02 (663)	0,03 (659)	NS	0,02 (1101)	0,03 (1096)	NS	NS	NS
rs6667500 (G)	0,41 (433)	0,48 (430)	7,14	0,0076	0,75 (0,61-0,93)	0,46 (658)	0,49 (671)	NS	0,44 (1091)	0,48 (1101)	7,39	0,006556	0,85 (0,75-0,96)

* frequenza dell'allele più raro (indicato tra parentesi nella colonna 1) e numero di campioni su cui il polimorfismo è stato analizzato

Tab. 5 Associazione con le frequenze genotipiche di CRIL

SNP		LES		controlli		χ^2	p	OR	95% CI
		n	freq	n	freq				
rs2796239	GG	166	0,36	163	0,31	NS	NS	0,68	0,48-0,98
	GA	233	0,51	260	0,50	NS	NS		
	AA	62	0,13	96	0,18	4,23	0,039600		
	tot	461		519					
		<i>Overall p value</i>					0,06691		
3'UTR+41	AA	250	0,60	203	0,48	11,65	0,000641	1,62	1,22-2,16
	GA	150	0,36	188	0,45	5,93	0,014888	0,70	0,53-0,94
	GG	16	0,04	31	0,07	4,21	0,040225	0,50	0,26-0,97
	tot	416		422					
		<i>Overall p value</i>					0,000962		
rs2761424	CC	266	0,61	208	0,48	14,98	0,000109	1,71	1,30-2,26
	CT	156	0,36	200	0,46	8,76	0,003074	0,66	0,50-0,87
	TT	15	0,03	29	0,07	NS	NS		
	tot	437		437					
		<i>Overall p value</i>					0,000205		
3'UTR+137	TT	156	0,36	129	0,30		0,06388	0,66	0,45-0,98
	CT	225	0,51	228	0,52	NS	NS		
	CC	56	0,13	79	0,18	4,30	0,038093		
	tot	437		436					
		<i>Overall p value</i>					0,038868		
rs6667500	CC	145	0,33	113	0,26	5,01	0,025197	1,41	1,04-1,91
	GC	223	0,52	222	0,52	NS	NS		
	GG	65	0,15	95	0,22	6,70	0,009628	0,62	0,43-0,90
	tot	433		430					
		<i>Overall p value</i>					0,008288		

Tab. 6 Frequenze genotipiche dei polimorfismi rs2796239, 3'UTR+137 e rs6667500 nei campioni rs2761424 T negativi appartenenti alla popolazione italiana

SNP		LES		controlli		statistica
		n	freq	n	freq	
rs2796239	GG	145	0,58	118	0,62	NS
	GA	89	0,36	63	0,33	NS
	AA	16	0,06	9	0,05	NS
3'UTR+137	TT	156	0,59	129	0,62	NS
	CT	91	0,34	70	0,34	NS
	CC	17	0,06	8	0,04	NS
rs6667500	CC	138	0,52	109	0,53	NS
	GC	104	0,40	85	0,41	NS
	GG	21	0,08	12	0,06	NS

Tab. 7 Frequenze geniche dei polimorfismi rs2796239, 3'UTR+137 e rs6667500 nei campioni rs2761424 T negativi appartenenti alla popolazione italiana

polimorfismo	allele	LES		controlli		statistica
		N*	freq	N*	freq	
rs2796239	A	250	0,24	190	0,21	NS
3'UTR+137	C	264	0,24	207	0,21	NS
rs6667500	G	263	0,28	206	0,26	NS

* numero di individui analizzati per ogni polimorfismo

Tab. 8 Associazione con gli aplotipi nella popolazione italiana (A) ed in quella spagnola (B)

A

aplotipo	frequenze		statistica			
	LES (n=378)	Controlli (n=381)	χ^2	p	OR	95% CI
GCTGC	0,567	0,506	5,31	0,02120	1,27	1,04-1,57
ATCGG	0,202	0,283	12,72	0,00036	0,65	0,51-0,82
ACCGG	0,162	0,138	NS	NS	NS	NS
GCTAG	0,019	0,028	NS	NS	NS	NS
GCTGG	0,022	0,016	NS	NS	NS	NS

B

aplotipo	frequenze		statistica	
	LES (n=671)	Controlli (n=678)	χ^2	p
GCTGC	0,525	0,500	NS	NS
ATCGG	0,246	0,253	NS	NS
ACCGG	0,170	0,164	NS	NS
GCTAG	0,023	0,033	NS	NS
GCTGG	0,017	0,027	NS	NS

I polimorfismi che compongono l'aplotipo sono elencati nel seguente ordine: rs2796239 (G/A), rs2761424 (C/T), 3'UTR+137 (T/C), 3'UTR+163 (G/A), rs6667500 (C/G). Il polimorfismo 3'UTR+41 (A/G), che è in LD assoluto con l'rs2761424 non è stato incluso nell'analisi. Analisi effettuata con il software Haploview.

Tab. 9 Frequenze alleliche ed analisi statistica dei tagSNPs nelle regioni centromeriche e telomeriche rispetto a *CRIL*

polimorfismo	allele	LES		controlli		statistica
		n	freq	n	freq	
CR1 rs9429944	T	215	0,25	205	0,25	NS
CR1 rs2274567	G	240	0,26	198	0,24	NS
CR1 rs2296160	T	240	0,20	200	0,21	NS
CR1 rs 3737002	A	237	0,20	202	0,25	NS
CR1 rs 6691117	C	237	0,28	206	0,25	NS
MCP rs2796270	G	216	0,42	214	0,43	NS
rs926631	T	214	0,37	215	0,43	p=0,07903
MCP rs2761437	T	216	0,14	212	0,19	NS
rs2796249	A	215	0,34	212	0,32	NS
MCP rs7144	C	215	0,28	207	0,30	NS
CD34 rs607952	T	181	0,40	202	0,44	NS
LOC148696 rs2724373	T	210	0,39	207	0,38	NS
MCP rs11118555	A	190	0,12	207	0,10	NS
CD34 rs2745955	A	213	0,32	209	0,30	NS
<i>CRIL</i> rs2796239	A	206	0,36	200	0,45	$\chi^2=5,41$ $p=0,0201$ $OR=0,70$ 95% $CI=0,52-0,95$
<i>CRIL</i> rs2761424	T	206	0,20	200	0,28	$\chi^2=6,51$ $p=0,0107$ $OR=0,65$ 95% $CI=0,46-0,91$
<i>CRIL</i> ex10+137	C	206	0,36	200	0,45	$\chi^2=4,94$ $p=0,0262$ $OR=0,72$ 95% $CI=0,54-0,96$
<i>CRIL</i> rs6667500	C	206	0,38	200	0,52	$\chi^2=8,15$ $p=0,0043$ $OR=0,66$ 95% $CI=0,49-0,88$

Le ultime 4 righe della tabella contengono le frequenze alleliche e l'analisi statistica relativa ai polimorfismi statisticamente associati di *CRIL* (rs2796239, rs2761424 ex10+137 rs6667500) nella sottocasistica esaminata per i polimorfismi centromerici e telomerici rispetto a *CRIL*.

Tab. 10A Associazione con gli aplotipi rs2761424 + rs926631 + rs2761437

aplotipo	frequenze		statistica		
	LES (n=206)	Controlli (n=200)	χ^2	p	OR (95% CI)
CCC	0,55	0,45	9,31	0,0023	1,53 (1,15-2,04)
CTC	0,22	0,23	NS	NS	NS
TTT	0,11	0,13	NS	NS	NS
TCC	0,07	0,11	3,63	0,0567	0,61 (0,36-1,03)
CTT	0,03	0,05	NS	NS	NS
TTC	0,02	0,03	NS	NS	NS

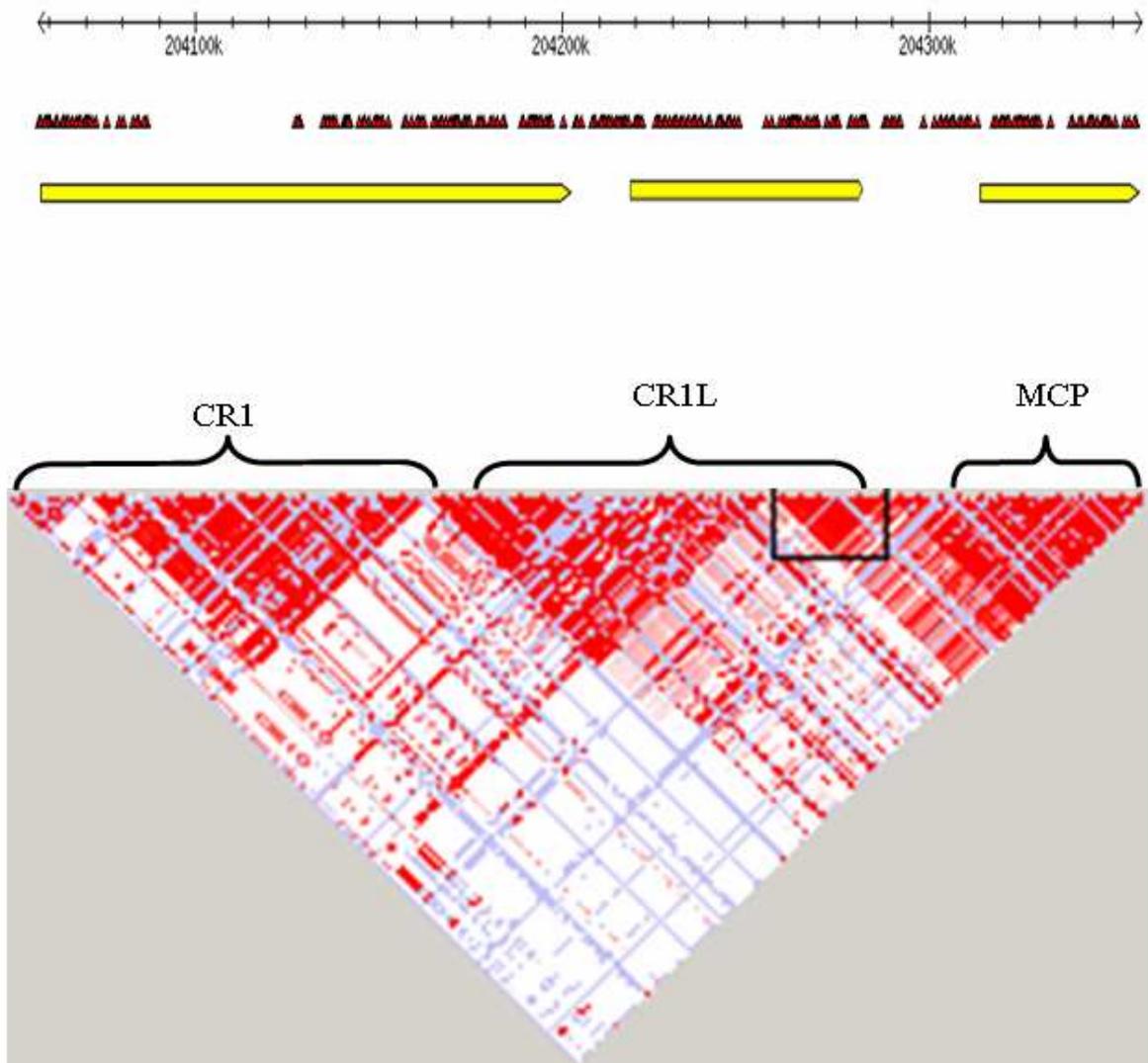
Tab. 10B Associazione con gli aplotipi rs2761424 + rs2761437

aplotipo	frequenze		statistica		
	LES (n=206)	Controlli (n=200)	χ^2	p	OR (95% CI)
CC	0,77	0,68	8,62	0,0033	1,59 (1,15-2,19)
TT	0,11	0,14	NS	NS	NS
TC	0,09	0,14	5,04	0,0248	0,60 (0,38-0,96)
CT	0,03	0,05	NS	NS	NS

Tab. 10C Associazione con gli aplotipi rs2761424 + rs926631

aplotipo	frequenze		statistica		
	LES (n=206)	Controlli (n=200)	χ^2	p	OR (95% CI)
CC	0,56	0,46	7,87	0,0050	1,48 (1,11-1,98)
CT	0,25	0,27	NS	NS	NS
TT	0,13	0,17	NS	NS	NS
TC	0,07	0,10	NS	NS	NS

Fig. 1 LD nella regione cromosomica compresa tra *CR1* ed *MCP*



Dati di genotipizzazione di HapMap sulle famiglie CEPH. Nell'elaborazione sono presenti tutti gli SNP al momento genotipizzati. Le aree rosse sono caratterizzate da $D' > 0,9$. Il riquadro contiene i polimorfismi di *CR1L* associati con il LES.

Fig 2 LD nella nostra popolazione tra i polimorfismi di *CRIL* e quelli di *CR1*

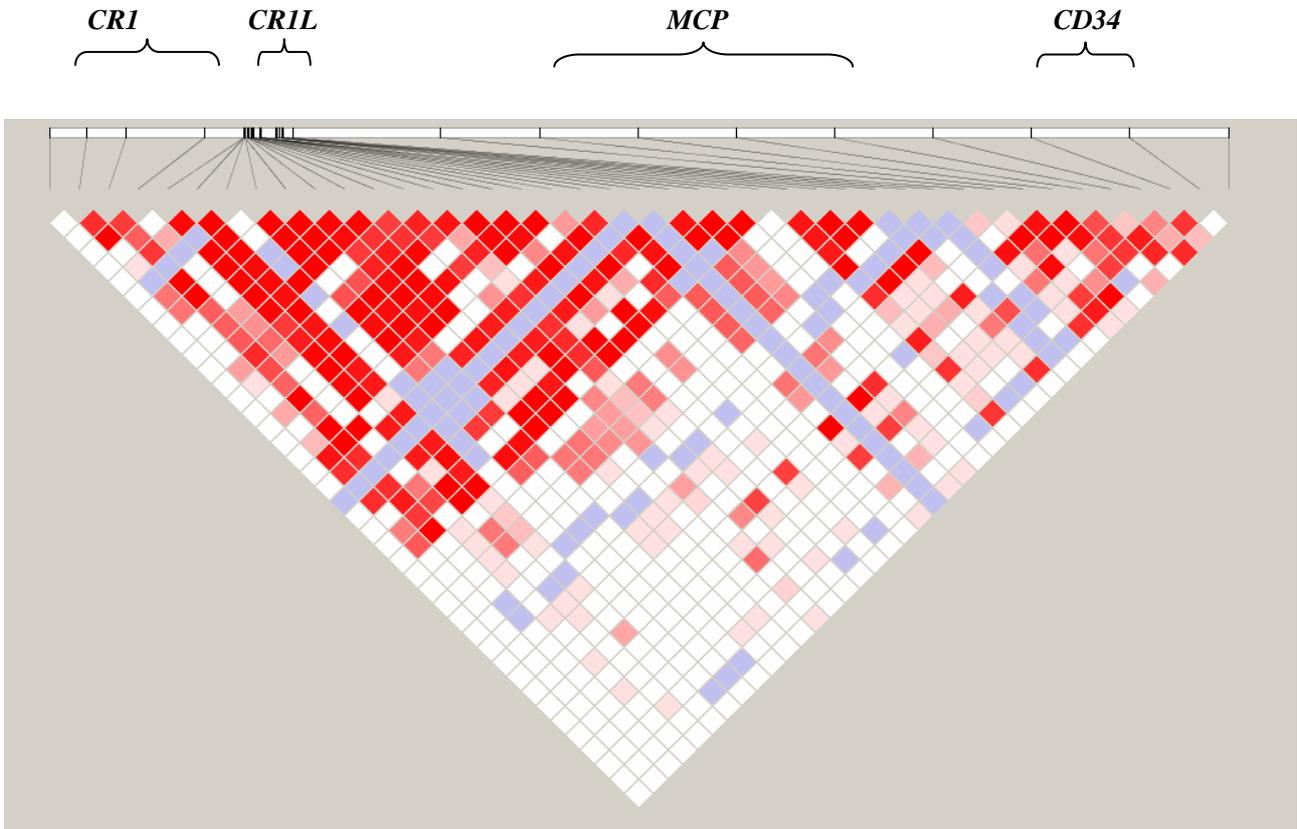
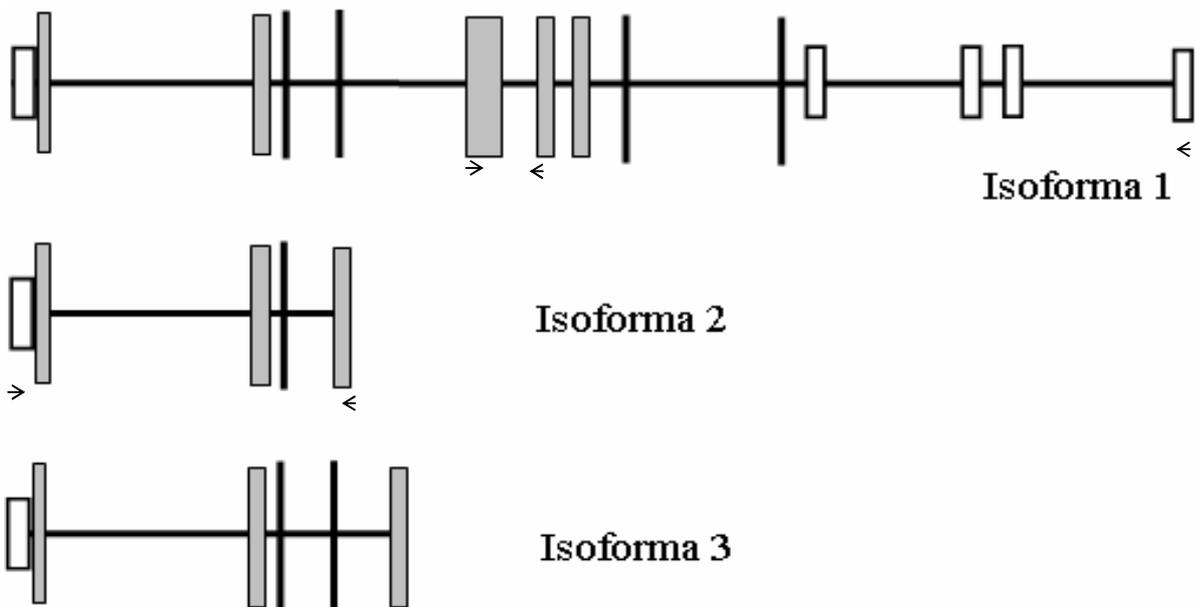


Fig 3 Le tre isoforme di *CRIL*



Le frecce indicano la posizione dei primers utilizzati per le RT-PCR.

Fig. 4 Sequenza di cDNA dell'isoforma 1 (Logar et al. 2004)

```

SCR 1
CTGATGACTTTGAGTTTCCCATTTGGGACATATCTGAACATGAATGCCGCCCTGGTTATTCCGGAAGACCGTTTTCTATCATCTGCCTAAAAAAGCTCAGTCTGGACAAGTGCTAAGGAC
      I G T Y L N Y E C R P G Y S G R P F S I I C L K N S V W T S A K D

SCR 2
AAGTGCAAACGTAATCATGTCTGTAATCCTCCAGATCCTGTGAATGGCATGGCAGCATGTGATCAAAGACATCCAGTTTCCAGATCCCAAATTAATATTCTTGTCTAAAGGATACCGACTC
K C K R K S C R N P P D P V N G M A H V I K D I Q F R S Q I K Y S C P K G Y R L

SCR 3
ATTGGTTCCTCGTCTGCCACATGCATCATCTCAGGCAACACTGTCATTTGGGATAATAAAACACCTGTTTGTGACAGAATTATTGTGGGCTACCCCCACCATCGCCAAATGGAGATTTC
I G S S S A T C I I S G N T V I W D N K T P V C D R I I C G L P P T I A N G D F

ACTAGCATCAGCAGAGAGTATTTTCACTATGGATCAGTGGTGACCTACCACTGCAATCTTGAAGCAGAGGGAAAAAGGTGTTTGTGAGCTTGTGGGTGAGCCCTCCATATACTGCACCAGC
T S I S R E Y F H Y G S V V T Y H C N L G S R G K K V F E L V G E P S I Y C T S

SCR 4
AAAGATGATCAAGTGGGCATCTGGAGTGGCCAGCCCTCAGTGCAATTACCTAACAAATGCAGCCCTCCAAATGTGGAAATGGAATATTGGTATCTGACAAACAGAAGCTTATTTTCC
K D D Q V G I W S G P A P Q C I I P N K C T P P N V E N G I L V S D N R S L F S

TTAAATGAAGTTGTGGAGTTAGGTGTCAGCCTGGCTTTGGCATGAAGGGCCCTCCCATGTGAAGTGCCAGGCCCTGAACAAATGGAGCCAGAGTTACCAAGCTGCTCCAGGGTATGT
L N E V V E F R C Q P G F G M K G P S H V K C Q A L N K W E P E L P S C S R V C

CAGCCADCTCCAGATGTCTGCATGCTGAGCGTACCCAAAGGGACAAGGACAACCTTTTACCCTGGGAGGAAAGTGTCTACAGCTGTGAGCCCGGCTACGACCTCAGAGGATCTACGTAT
Q P P P D V L H A E R T Q R D K D N F S P G Q E V F Y S C E P G Y D L R G S T Y

SCR 6
TTGCACTGCACACCCAGGGAGACTGGAGCCCTCGAGCCCCAGATGTGAAGTGAATCCTGTGATGACTTCTGGGCCAAGCTTCTAATGGCCATGTGCTATTTCACCTAATCTCCAG
L H C T P Q G D W S P A A P R C E V K S C D D F L G Q L P N G H V L F P L N L Q

CTTGGAGCAAAAGTGGATTGTTTGTGATGAAGGATTCAATTAAGGCAAGCTCTGCTAGTACTGTGTTTGGCTGGAATGGAAGCCTTTGGAATAGCAGTGTTCAGTGTGTGAA
L G A K V D F V C D E G F Q L K G S S A S Y C V L A G M E S L W N S S V P V C E

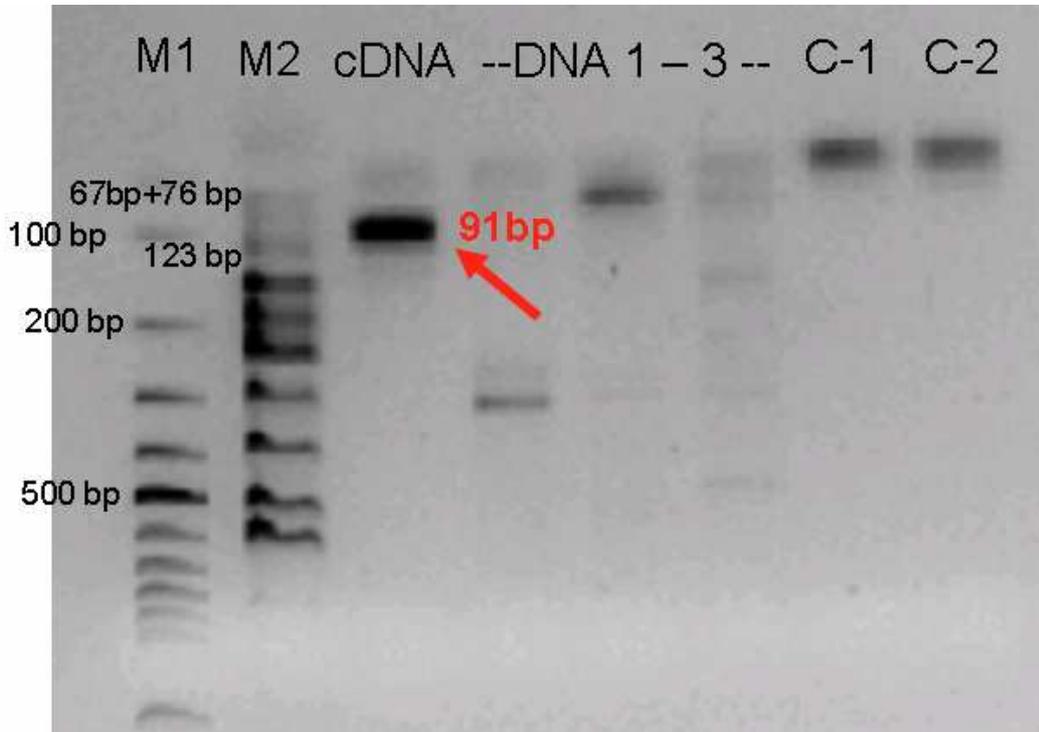
SCR 7
CGTAAATCATGTGAAACTCCTCCAGTTCAGTGAATGGCATGGTGCATGTGATCACAGACATCCATGTTGGATCCAGAATCAACTATTCTTGTACTACAGGGTCTGATTAAAAGGCAAG
R K S C E T P P V P V N G M V H V I T D I H V G S R I N Y S C T T G F -

GTCTGCTAGTCATTGTGCTTGGCTGGAAGTGAAGCCCTTTGGAATAGCAGTGTTCAGTGTGTTAACAAATCTTTTGTCCAAATCCTCCAGCTATCCTAATGGGAGACACACAGGAA
CTCCCTTGGAGATATTCCCTATGGAAGGAGTATCTTACACATGTGACCCCAAGCAGAGGGATGACCTTCAACCTCATTGGGGAGAGCACCATCCGCCGACAAGTGAACCTC
ATGGGAATGGGTTTGGAGCAGCCCTGCCCTCGCTGTGAACCTTCTGTTGGTGTGTTTACATGATGCTCTTATAGTTGGCACTTTACTTGGTACGATCATCTTTATTTAAATCATCA
TTTCTCTATTGGATAATTTTCAAGCACAGAAAAAGGGACCTTCTTGACAAAGTACTATACAGCTGAAG - 1630

```

Sequenza nucleotidica e sequenza aminoacidica dedotta dell'isoforma 1 di *CRIL*, come è stata riportata da Logar et al. nel 2004. La sequenza nucleotidica è indicata in maiuscolo con il codice a singola lettera, e gli aminoacidi sono posizionati sotto ai rispettivi codoni. I primers per la RT-PCR long transcript sono stati evidenziati in giallo, mentre il primer antisense utilizzato per l'emi-nested è evidenziato in rosso. Rispetto alla sequenza depositata nella banca dati ncbi.nlm.nih.gov quella riportata da Logar et al. è incompleta al 5,'manca cioè del primo esone e di parte del secondo. Questo fatto tuttavia non influenza la nostra analisi, in quanto i primers utilizzati sono stati scelti molto più a valle.

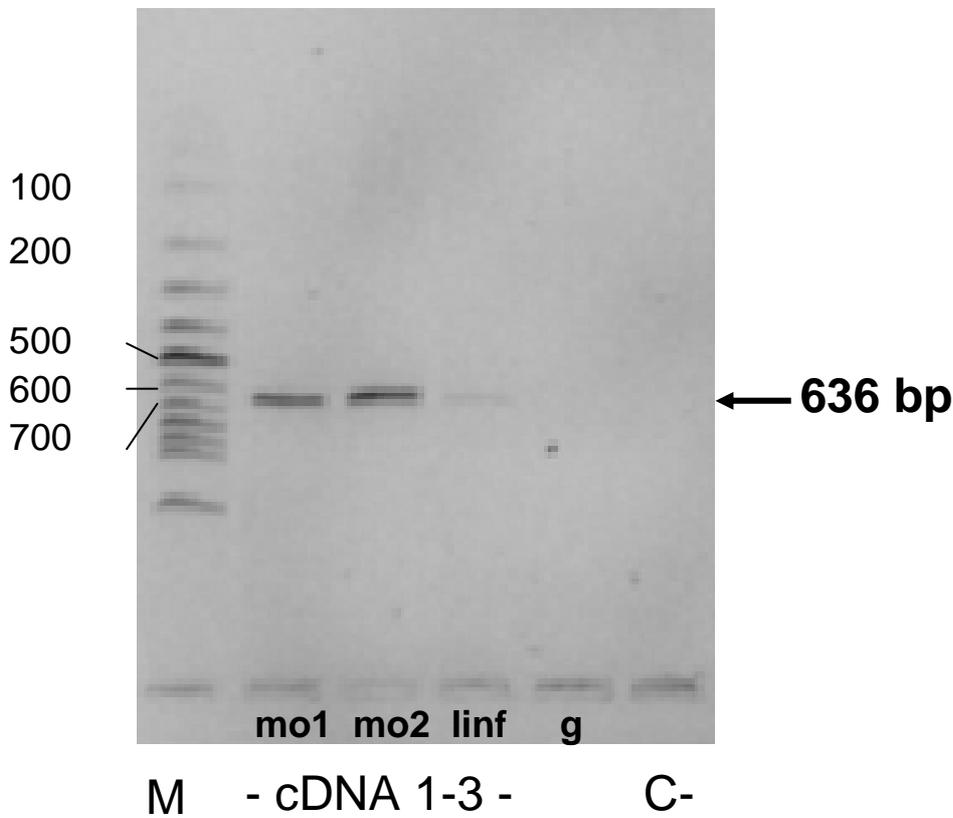
Fig. 5 Nested su RT-PCR di *CR1L* isoforma 1



Emi-nested dell'RT-PCR "long-transcript" di CR1L su cDNA di linfociti attivati.

Le linee 1 e 2 sono state caricate con due differenti marcatori di peso molecolare (100bp DNA ladder e pBR322 DNA-Msp I digest). Sono stati indicati a lato i valori di peso molecolare utili per identificare la banda a 91bp (indicata dalla freccia rossa) nella terza linea e della banda più intensa del marcatore 100bp DNA ladder (500bp). Le linee 4-6 contengono tre diversi campioni di DNA genomico amplificati co-amplificati con il cDNA in entrambe le fasi dell'amplificazione. Le bande che si possono osservare non hanno il peso molecolare corretto e sono prodotti aspecifici. Le ultime due linee (C-1 e C-2) contengono rispettivamente il controllo negativo della PCR "long transcript" riamplicato ed il controllo negativo della PCR nested.

Fig. 6 RT-PCR di *CRIL* isoforma 2



RT-PCR dell'isoforma 2 di *CRIL*. mo1 e mo2 = midollo osseo 1 e 2; linf = linfociti non attivati, g = DNA genomico. La prima linea è stata caricata col marcatore di peso molecolare 100bp DNA ladder. Nelle linee 2-4 si osserva una banda di peso molecolare compreso tra le 600 e le 700 bp, compatibile con le dimensioni del frammento che si stava cercando (636 bp). La banda non è visibile in corrispondenza della linea caricata con l'amplificato su DNA, per cui non è dovuta ad una contaminazione da DNA genomico.

BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar F, Gonzales-Escribano MF, Sanchez-Roman J, Nunez-Roldan A. MCP-1 promoter polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2001; 58:335-338
2. Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ et al. Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature* 2006; 439:851-855
3. Akahoshi M, Kakashima H, Shirakawa T. Roles of genetic variations in signalling/immunoregulatory molecules in susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Seminars in Immunology* 2006; 18: 224-229
4. Birmingham DJ, Irshaid F, Gavit KF, Nagaraja HN, Yu CY, Rovin BH, Hebert LA. A polymorphism in the type one complement receptor (CR1) involves an additional cysteine within the C3b/C4b binding domain that inhibits ligand binding. *Molecular Immunology* 2007 in press
5. Birmingham DJ, Hebert LA. CR1 and CR1-like: the primate immune adherence receptors. *Immunological Reviews* 2001; 180:100-111
6. Blakemore AIF, Tarlow JK, Cork MJ, Gordon C, Emery P, Duff GW. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism as a disease severity factor in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 1994; 37(9): 1380-1385
7. Blom AM. Structural and functional studies of complement inhibitor C4b-binding protein. *Biochem. Soc. Trans.* 2001; 30:978-982
8. Boackle 2003. Complement and autoimmunity. *Biomedicine & Pharmacology* 2003; 57:269-273
9. Brown KM, Sacks SH, Sheerin NS. Mechanism of disease: the complement system in renal injury—new ways of looking at an old foe. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2007 May;3(5):277-86
10. Carrol MC. A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Immunology* 2004; 4:825-831.
11. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, Doménech I, Aydintung O, Jedryka-Göral A, de Ramón E, Galeazzi M, Haga HJ, Mathieu A, Houssieau F, Ingelmo M, Hughes G, European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. Systemic Lupus Erythematosus: Clinical and Immunologic Patterns of Disease expression in a cohort of 1,000 Patients. *Medicine* 1993; 72(2): 113-123
12. Colten HR. Complement deficiencies. *Annu. Rev. Immunol.* 1992; 10: 809-834
13. D'Alfonso S, Rampi M, Bocchio D, Colombo G, Scorza-Smeraldi R, Momigliano-Richiardi P. Systemic Lupus Erythematosus candidate genes in the Italian population. Evidence for a Significant Association with Interleukin-10. *Arthritis & Rheumatism* 2000; 43(1): 120-128
14. Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, Walker A, Mack TM. A revised estimate of twin concordance in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 1992; 35(3): 311-318
15. Dragon-Durey MA, Quartier P, Frémeaux-Bacchi V, Blouin J, de Barace C, Prieur A, Weiss L, Fridman W. Molecular Basis of a Selective C1s Deficiency Associated with Early Onset Multiple Autoimmune Diseases. *The Journal of Immunology* 2001; 166: 7612-7616
16. Dragon-Durey MA, Rougier N, Clauvel JP, Caillat-Zucman S, Remy P, Guillevin L, Liote F, Blouin J, Arieu F, Lambert BU, Kazatchkine MD, Weiss L. Lack of evidence of a specific role for C4A gene deficiency in determining disease susceptibility among C4-deficient patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clinical and Experimental Immunology* 2001; 123(1): 133-139
17. Duits AJ, Bootsma H, Derksen RHW, Spronk PE, Kater L, Kallenberg CGM, Capel PJA, Westerdal NAC, Spierenburg GTH, Gmelig-Meyeling FHJ, van de Winkel JGJ. Skewed distribution of IgG Fc receptor IIa (CD32) polymorphism is associated with renal disease in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 1995; 38(12): 1832-1836
18. Eskdale J, Wordsworth P, Bowman S, Field M, Gallagher G. Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1997; 49:635-639
19. Ferreira-Neira I, Calaza M, Alonso-Perez E, Marchini M, Scorza R, Sebastiani GD, Blanco FJ, Rego I, Pullmann R Jr, Pullmann R, Kallenberg CG, Bijl M, Skopouli FN, Mavromati M, Migliaresi S, Barizzone N, Ruzickova S, Dostal C, Schmidt RE, Witte T, Papasteriades C, Kappou-Rigatou I, Endreffy E, Kovacs A, Ordi-Ros J, Balada E, Carreira P, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Opposed independent effects and epistasis in the complex association of IRF5 to SLE. *Genes Immun.* 2007;8(5):429-38
20. Flierman R, Daha MR. The clearance of apoptotic cells by complement. *Immunobiology* 2007; 212:363-370
21. Ghiran I, Barbashov SF, Klickstein LB, Tas SW, Jensenius JC, Nicholson-Weller A. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J. Exp. Med.* 2000; 192(12):1797-1807
22. Graham R, Langefeld C, Gaffney P, Ortmann W, Selby S, Baechler E, Shark K, Ockenden T, Rohlf K, Moser K, Brown W, Gabriel S, Messner R, King R, Horak P, Elder J, Stuart P, Rich S, Behrens T. Genetic linkage and transmission disequilibrium of marker haplotypes at chromosome 1q41 in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis research* 2001; 3: 299-305
23. Graham RR, Kozyrev SV, Baechler EC, Reddy MV, Plenge RM, Bauer JW, Ortmann WA, Koeuth T, González Escribano MF; Argentine and Spanish Collaborative Groups, Pons-Estel B, Petri M, Daly M, Gregersen PK, Martín J, Altshuler D, Behrens TW, Alarcón-Riquelme ME. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2006;38(5):550-5.

24. Graham RR, Kyogoku C, Sigurdsson S, Vlasova IA, Davies LR, Baechler EC, Plenge RM, Koeth T, Ortmann WA, Hom G, Bauer JW, Gillett C, Burt N, Cunninghame Graham DS, Onofrio R, Petri M, Gunnarsson I, Svenungsson E, Rönnblom L, Nordmark G, Gregersen PK, Moser K, Gaffney PM, Criswell LA, Vyse TJ, Syvänen AC, Bohjanen PR, Daly MJ, Behrens TW, Altshuler D. Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(16):6758-63.
25. Grennan DM, Parfitt A, Manolis N, Huang Q, Hyland V, Dunckley H, Doran T, Gatenby P, Badcock C. Family and twin studies in systemic lupus erythematosus. *Dis Markers* 1997; 13(2): 93-98
26. Hawn TR, Wu H, Grossman JM, Hahn BH, Tsao BP, Aderem A. A stop codon polymorphism of Toll-like receptor 5 is associated with resistance to systemic lupus erythematosus. *PNAS* 2005; 102(30):10593-10597
27. Herrera AH, Xiang L, Martin SG, Lewis J, Wilson JG. Analysis of complement receptor type 1 (CR1) expression on erythrocytes and of CR1 allelic markers in caucasian and african american populations. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1998; 87(2):176-183
28. Hrycek A, Kusmierz D, Mazurek U, Wilczok T. Human cytomegalovirus in patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 2005; 38(7):487-91
29. Johanneson B, Alarcón-Riquelme ME. An update on the genetics of systemic lupus erythematosus. *Isr Med Assoc J.* 2001;3(2):88-93.
30. Johansson CM, Zunec R, García MA, Scherbarth HR, Tate GA, Paira S, Navarro SM, Perandones CE, Gamron S, Alvarellos A, Graf CE, Manni J, Berbotto GA, Palatnik SA, Catoggio LJ, Battagliotti CG, Sebastiani GD, Migliaresi S, Galeazzi M, Pons-Estel BA, Alarcón-Riquelme ME; Collaborative Group on the Genetics of SLE; Argentine Collaborative Group. Chromosome 17p12-q11 harbors susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Hum Genet.* 2004;115(3):230-8.
31. Karassa FB, Trikalinos TA, Ioannidis JP. Role of the Fcγ receptor IIa polymorphism in susceptibility to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(6): 1563-71.
32. Kim DD, Song WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clinical Immunology.* 2006; 118: 127-136
33. Klickstein LB, Barbashov SF, Liu T, Jack RM, Nicholson-Weller A. Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. *Immunity* 1997; 7(3): 345-55
34. Klickstein, L. B., T. J. Bartow, V. Miletic, L. D. Rabson, J. A. Smith, and D. T. Fearon.. Identification of distinct C3b and C4b recognition sites in the human C3b/C4b receptor (CR1, CD35) by deletion mutagenesis. *J. Exp. Med.* 1988; 168:1699.
35. Kotzin BL. *Systemic Lupus Erythematosus Cell* 1996; 85: 303-306
36. Krushkal J, Bat O, Gigli I. Evolutionary relationships among proteins encoded by the regulator of complement activation gene cluster. *Molecular Biology and Evolution* 2000; 17:1718-1730
37. Krych, M., D. Hourcade, and J. P. Atkinson.. Sites within the complement C3b/C4b receptor important for the specificity of ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991; 88:4353.
38. Krych, M., L. Clemenza, D. Howdeshell, R. Hauhart, D. Hourcade, and J. P. Atkinson.. Analysis of the functional domains of complement receptor type 1 (C3b/C4b receptor; CD35) by substitution mutagenesis. *J Biol Chem* 1994; 269:13273.
39. Krych, M., R. Hauhart, and J. P. Atkinson.. Structure-function analysis of the active sites of complement receptor type 1. *J Biol Chem* 1998; 273:8623.
40. Lee YH, Harley JB, Nath SK. CTLA-4 polymorphisms and systemic lupus erythematosus (SLE): a meta-analysis. *Hum Genet* 2005; 116:361-367
41. Lee YH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG, Nath SK, Harley JB. The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune diseases--a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford).* 2007;46(1):49-56.
42. Lee-Kirsch MA, Gong M, Chowdhury D, Senenko L, Engel K, Lee YA, de Silva U, Bailey SL, Witte T, Vyse TJ, Kere J, Pfeiffer C, Harvey S, Wong A, Koskenmies S, Hummel O, Rohde K, Schmidt RE, Dominiczak AF, Gahr M, Hollis T, Perrino FW, Lieberman J, Hübner N. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2007;39(9):1065-7.
43. Li X, Wu j, Carter RH et al. A novel polymorphism in the Fc γ receptor IIB (CD32B) transmembrane region alters receptor signalling. *Arthritis Rheum* 2003; 48:3242-3252
44. Lindqvist & Alarcón-Riquelme. The Genetics of Systemic Lupus Erythematosus (Review). *Scandinavian Journal of Immunology* 1999; 50(6): 562-577
45. Linker-Israeli M, Wallace DJ, Prehn J, Michael D, Honda M, Taylor KD, Paul-Labrador M, Fischel-Ghodsian N, Fraser PA, Klinenberg JR. Association of IL-6 gene alleles with systemic lupus erythematosus (SLE) and with elevated IL-6 expression. *Genes Immun.* 1999;1(1):45-52.
46. Logar CM, Chen W, Schmitt H, Yu CY, Birmingham DJ. A human CR1-like transcript containing sequence for a binding protein for iC4 is expressed in hematopoietic and fetal lymphoid tissue. *Mol Immunol.* 2004;40(11):831-40.
47. Magnusson V, Nakken B, Bolstad AI, Alarcón-Riquelme ME, Cytokine Polymorphisms in Systemic Lupus Erythematosus and Sjögren's Syndrome. *Scandinavian Journal of Immunology* 2001; 54(1-2): 55-67
48. Manzi S, Navratil JS, Ruffing MJ, Liu C, Danchenko N, Nilson SE, Krishnaswami S, King DES, Kao A, Ahearn JM. Measurement of erythrocyte C4d and complement receptor 1 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis e Rheumatism* 2004; 50(11): 3596-3604.

49. McLure CA, Williamson JF, Steward BJ, Keating PJ, Dawkins RL. Genomic analysis reveals a duplication of eight rather than seven short consensus repeats in primate CR1 and CR1L: evidence for an additional set shared between CR1 and CR2. *Immunogenetics* 2004; 56:631-638
50. McLure CA, Williamson JF, Steward BJ, Keating PJ, Dawkins RL. Indels and imperfect duplication have driven the evolution of human complement receptor 1 (CR1) and CR1-like from their precursor CR1 alpha: importance of functional sets. *Human Immunology* 2005; 66: 258-273
51. Mehrian DA, Quismorio FP Jr, Strassman G, Stimmler MM, Horwitz DA, Kitridou SC et al. Synergistic effect between IL-10 and bcl-2 genotypes in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 596-602
52. Miwa T, Song WC. Membrane complement regulatory proteins: insight from animal studies and relevance to human disease. *International Immunopharmacology* 2001; 1:445-459
53. Morgan BP, Walport MJ. Complement deficiency and disease (overview). *Immunology Today* 1991; 12(9): 301-306
54. Nath SK, Harley JB, Lee YH. Polymorphisms of complement receptor 1 and interleukin-10 genes and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Hum Genet* 2005; 118:225-234
55. Prokunina L, Castillejo-López C, Öberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, Brookes AJ, Tentler D, Kristjansdóttir H, Gröndal G, Bolstad AI, Svenungsson E, Lundberg I, Sturfelt G, Jönsson A, Truedsson L, Lima G, Alcocer-Varela J, Jonsson R, Gyllensten UB, Harley JB, Alarcon-Segovia D, Steinsson K, Alarcon-Riquelme ME. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nature Genetics* 2002; 32: 666-669
56. Prokunina L, Gunnarsson I, Sturfelt G, Truedsson L, Selingman VA, Olson JL, Seldin MF, Criswell LA, Alarcon-Riquelme ME. The systemic lupus erythematosus-associated PDCD1 polymorphism PD1.3A in lupus nephritis. *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50(1):327-333
57. Rao N, Ferguson DJ, Lee SF, Telen MJ. Identification of human erythrocyte blood group antigens on the C3b/C4b receptor. *J Immunol* 1991; 146(10):3502-7.
58. Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 295:344-348
59. Rupert KL, Moulds JM, Yang Y, Arnett FC, Warren RW, Reveille JD, Myones BL, Blanchong CA, Yu CY. The molecular basis of complete complement C4A and C4 deficiencies in a systemic lupus erythematosus patient with homozygous C4A and C4B mutant genes. *J Immunol* 2002; 169(3): 1570-8
60. Russell AI, Cunningham-Graham DS, Shepard C, Robertson CA, Whittaker J, Meeks J, Powell RJ, Isenberg DA, Walport MJ, Vyse TJ. Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus. *Human Molecular Genetics* 2004; 13(1):137-147
61. Salmon JE, Millard S, Schachter LA, Arnett FC, Ginzler EM, Gourley MF, Ramsey-Goldman R, Peterson MGE, Kimberly RP. FcγRIIa Allels Are Heritable Risk Factors for Lupus Nephritis in African Americans. *The Journal of Clinical Investigation* 1996; 97(5):1348-1354
62. Shirai T, Nishimura H, Jang Y, Hirose S. Genome Screening for Susceptibility Loci in Systemic Lupus Erythematosus. *American Journal of Pharmacogenomics* 2002; 2(1): 1-12
63. Sigurdsson S, Nordmark G, Göring HHH, Lindroos K, Wiman AC, Sturfelt G, Jönsson A, Rantapää-Dahlqvist, Möller B, Kere J, Koskenmies S, Widén E, Eloranta ML, Julkunen H, Kristjansdóttir H, Steinsson K, Alm G, Rönnblom L, Syvänen AC. Polymorphisms in the tyrosinase kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with Systemic Lupus Erythematosus. *A. J. Hum. Genet.* 2005; 76:528-537
64. Simard JF, Costenbader KH. What can epidemiology tell us about systemic lupus erythematosus. *Int J Clin Pract* 2007; 61:1170-1180
65. Sirikong M, Tsuchiya N, Chandanayingyong D, Bejerachandra S, Suthipinittharm P, Luangtrakool K, Srinak D, Thongpradit R, Siriboonrit U, Tokunaga K. Association of HLA-RRB1*1502-DQB1*0501 haplotype with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens* 2002; 59(2): 113-118
66. Song YW, Han C, Kang S, Baek H, Lee E, Shin C, Hahn B, Tsao BP. Abnormal distribution of Fcγ receptors type IIa polymorphisms in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 1998; 41(3):421-426
67. Sturfelt G, Truedsson L. Complement and its breakdown products in SLE. *Rheumatology* 2005; 44:1227-1232.
68. Sullivan KE, Wooten C, Schemeckpeper BJ, Goldman D, Petri MA. A promoter polymorphism of tumor necrosis factor alpha associated with systemic lupus erythematosus in African-Americans. *Arthritis & Rheumatism* 1997; 40: 2207-2211
69. Tanaka Y, Nakashima H, Hisano C, Kohsaka T, Nemoto Y, Niino H, Otsuka T, Otsuka T, Imamura T, Niho Y. Association of the interferon-gamma receptor variant (Val14Met) with systemic lupus erythematosus. *Immunogenetics.* 1999;49(4):266-71.
70. Tas SW, Klickstein LB, Barbashov SF, Nicholson-Weller A. C1q and C4b bind simultaneously to CR1 and additively support erythrocyte adhesion. *The Journal of Immunology* 1999; 163:5056-5063
71. Tsao BP, Cantor RM, Grossman J, Shen N, Teophilov N, Wallace D, Arnett F, Hartung K, Goldstein R, Kalunian K, Hahn B, Rotter J. PARP alleles within the linked chromosomal region are associated with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Clinical Investigation* 1999; 103(8): 1135-1140
72. Tsao BP, Cantor RM, Grossman J, Shen N, Teophilov N, Wallace D, Arnett F, Hartung K, Goldstein R, Kalunian K, Hahn B, Rotter J. PARP alleles within the linked chromosomal region are associated with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Clinical Investigation* 1999; 103(8): 1135-1140
73. Wallace JD, Hahn BH. *Dubois' Lupus erythematosus*. 1993; Lea & Febiger, Philadelphia and London; 4th edition.

74. Wilson AG, Gordon C, di Giovine Fs et alii. A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha. *Eur J Immunol* 1994; 24: 191-195
75. Wong WW, Cahill JM, Rosen MD, Kennedy CA, Bonaccio ET, Morris MJ, Wilson JG, Klickstein LB, Fearon DT. Structure of the human CR1 gene. Molecular basis of the structural and quantitative polymorphisms and identification of a new CR1-like allele. *J. Exp. Med.* 1989; 169:(847-863)
76. Wong WW, Cahill JM, Rosen MD, Kennedy CA, Bonaccio ET, Morris MJ, Wilson JG, Klickstein LB, Fearon DT. Structure of the human CR1 gene. Molecular basis of the structural and quantitative polymorphisms and identification of a new CR1-like allele. *J. Exp. Med.* 1989; 169:(847-863)

SEZIONE 2:

CORSI FREQUENTATI (anno 2007-2008)

-Corso di Inglese – Prof. Colin Irving-Bell.

SEMINARI FREQUENTATI (anno 2007-2008)

-14/01/2008 – Ten. Dott. Giorgio Portera: **Biologia molecolare e genetica in ambito forense: principali applicazioni e sviluppo delle nuove tecniche**

-21/01/2008 - Dr. Susanne Radicke: **K⁺channel in the heart in and out of control**

-23/01/2008 - Dr Jim Norman: **Integrin trafficking and tumour cell invasiveness**

-24/01/2008 - Prof. Mario Raspanti: **La microscopia a forza atomica nella ricerca biomedica: dalle immagini alle interazioni**

-06/02/2008 - Dott. Gianluca Debellis: **Metodi e applicazioni delle nuove tecnologie di sequenziamento ultramassivo**

-05/03/2008 - Annalisa Macagno, PhD: **Analytic vaccinology and human cytomegalovirus: human monoclonal antibodies as tools to identify novel antigens for protective vaccination**

-06/03/2008 - Prof. Enzo Medico: **Applications of gene expression profiling to cancer research**

-03/04/2008 - Prof. Fabrizio Barbetti: **Mutazione del gene dell'insulina come causa di diabete neonatale/infantile (MDI): un nuovo esempio di malattia da "misfolding"**

-09/04/2008 - Prof. Gaetano Cairo: **Modificazioni del metabolismo del ferro nella risposta infiammatoria**

-16/04/2008 - ILO Piemonte: **Proprietà intellettuale e brevettazione nelle scienze della vita**

-22/05/2008 - Prof. Domenico Valle: **Dal laboratorio alla clinica**

-23/05/2008 - Prof. Umberto Pagotto: **Sistema degli endocannabinoidi: nuovo target terapeutico per l'obesità e le sue complicanze cardio-metaboliche**

-26/05/2008 - Prof.ssa Orsetta Zuffardi: **Copy number variations: non solo ritardo mentale**

-5/06/2008 - ILLUMINA SEMINAR SERIES: **From Whole-Genome to Whole-Solution, Disease Analysis Tools for the Next Generation**

-26/06/2008 - Dott.ssa Maria Grazia Tibiletti: **Tecniche FISH nello studio dei linfomi non-Hodgkin**

-03/07/2008 - Prof. Francesco Scolari: **Recenti Aspetti in tema di malattie uromodulina associate**

-01/07/2008 - Dr. Andrew Bradbury (M.D., Ph.D.): **Recombinant protein expression**

-02/07/2008 - Dr. Andrew Bradbury (M.D., Ph.D.): **Recombinant antibodies and other affinity reagents**

-16/07/2008 - Dr. Andrew Bradbury (M.D., Ph.D.): **Display technologies: phage yeast bacteria and ribosoma**

-18/07/2008 - Dr. Andrew Bradbury (M.D., Ph.D.): **Fluorescent proteins**

CONGRESSI FREQUENTATI (elenco completo: denominazione congresso, sede, data)

-**Symposium in: NANOTECHNOLOGY AND BIOIMAGING novel approaches in diagnosis and drug delivery**
Università del Piemonte Orientale, via Solaroli 17 NOVARA 20/12/2007 -

COMUNICAZIONI A CONGRESSI (elenco completo: autori, titolo, denominazione congresso, sede, data)

A) Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)

B) Altre comunicazioni

- D'Alfonso S, Bolognesi E, Guerini FR, Bergamaschi L, Barizzone N, Ferrante D, Castelli L, Bocca S, Agliardi C, Ferrante P, Naldi P, Maurizio Leone M, Caputo D, Ballerini C, Salvetti M, Galimberti D, Massacesi L, Trojano M, Momigliano-Richiardi P.
Associazione di una variazione di sequenza nel gene MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) con la suscettibilità alla Sclerosi Multipla (SM)
X congresso nazionale SIGU, Salsomaggiore Terme, novembre 2007

ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO (elenco completo)

- D'Alfonso S, Bolognesi E, Guerini FR, **Barizzone N**, Bocca S, Ferrante D, Castelli L, Bergamaschi L, Agliardi C, Ferrante P, Naldi P, Leone M, Caputo D, Ballerini C, Salvetti M, Galimberti D, Massacesi L, Trojano M, Momigliano-Richiardi P.
A sequence variation in the MOG gene is involved in multiple sclerosis susceptibility in Italy.
Genes Immun. 2008 9(1):7-15.
- Kozyrev SV, Abelson AK, Wojcik J, Zaghlool A, Linga Reddy MV, Sanchez E, Gunnarsson I, Svenungsson E, Sturfelt G, Jönsen A, Truedsson L, Pons-Estel BA, Witte T, D'Alfonso S, **Barizzone N**, Danieli MG, Gutierrez C, Suarez A, Junker P, Laustrop H, González-Escribano MF, Martin J, Abderrahim H, Alarcón-Riquelme ME.
Functional variants in the B-cell gene BANK1 are associated with systemic lupus erythematosus.
Nat Genet. 2008 40(2):211-6.
Erratum in: *Nat Genet.* 2008 Apr;40(4):484. Barizzone, Nadia [corrected to Barizzone, Nadia].
- Cappellano G, Orilieri E, Comi C, Chiochetti A, Bocca S, Boggio E, Bernardone IS, Cometa A, Clementi R, **Barizzone N**, D'Alfonso S, Corrado L, Galimberti D, Scarpini E, Guerini FR, Caputo D, Paolicelli D, Trojano M, Figà-Talamanca L, Salvetti M, Perla F, Leone M, Monaco F, Dianzani U.
Variations of the perforin gene in patients with multiple sclerosis.
Genes Immun. 2008 9(5):438-44.