

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



Dottorato di Ricerca

in

Medicina Molecolare

Ciclo XXII

Relazione II° anno

**Analisi del gene SH2D1A in pazienti con
Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa**

**Candidato: Sara Bocca
Tutor: Prof. Umberto Dianzani**

1.INTRODUZIONE

1.1 IL SISTEMA IMMUNITARIO E L'APOPTOSI.

L'apoptosi svolge un ruolo fondamentale sia nello sviluppo delle cellule degli organi linfoidi primari, che nella regolazione della risposta immunitaria delle cellule mature. Una delle caratteristiche del sistema immunitario è la capacità di discriminare tra antigeni *self* e *non-self*, facendo in modo che si sviluppi una risposta immunitaria solo contro sostanze estranee all'organismo e favorendo la tolleranza verso gli antigeni autologhi (fenomeno noto come *tolleranza al self*). Nel caso di una mancata tolleranza segue una risposta immune verso i propri costituenti antigenici, dando origine a malattie autoimmuni.

I processi fondamentali che richiedono una corretta morte cellulare programmata sono la maturazione dei linfociti B e T nel midollo osseo e nel timo, il controllo dell'attivazione e dello spegnimento della risposta immune e lo sviluppo di attività effettrici, come l'attività citotossica (1).

Lo sviluppo dei linfociti T non è regolato solo dalla proliferazione e dal differenziamento ma anche da una corretta apoptosi. Infatti l'attivazione dei linfociti a cellule effettrici deve essere antigene specifica e deve essere limitata nel tempo: dopo che l'antigene è stato eliminato, i linfociti devono andare incontro a morte cellulare programmata.

Anche i timociti che compiono uno scorretto processo di riarrangiamento del TCR (*T-cell receptor*) o riconoscono antigeni *self*, sono eliminati per apoptosi: processo noto come *selezione negativa*.

Lo spegnimento della risposta immunitaria è essenziale per garantire una protezione nei confronti dell'autoimmunità: se i linfociti non vanno in apoptosi dopo che gli antigeni *non-self* sono stati eliminati, c'è il rischio che riconoscano per errore antigeni *self* e scatenino una reazione autoimmune (2).

L'apoptosi può essere indotta attraverso due vie principali: la via estrinseca innescata da specifici recettori di morte espressi sulla membrana cellulare e la via intrinseca, che agisce a livello del mitocondrio. I recettori di morte trasmettono segnali apoptotici grazie al legame con uno specifico ligando (3).

Un'altra forma di apoptosi attraverso la quale i linfociti T attivati vanno incontro a morte è l'AICD (*Activation Induced Cell Death*).

L'AICD è coinvolta nella tolleranza periferica controllando l'espansione dei linfociti T stimolati attraverso la via apoptotica dipendente da Fas. In periferia i linfociti T se continuamente stimolati dal TCR vanno incontro a AICD, risultato dell'interazione tra il recettore Fas e il suo ligando.

Mutazioni a carico di Fas o del suo ligando sono note indurre lo sviluppo di malattie autoimmuni nel topo e nell'uomo (4).

1.1.2 IL SISTEMA FAS/ FAS LIGANDO (FasL).

Fas (CD95/Apo1) è una glicoproteina transmembrana di 45-48 Kd. Esso è un recettore della superficie cellulare, appartenente alla superfamiglia dei recettori del TNFR (*tumor necrosis factor receptor*), una vasta famiglia di recettori coinvolti nello sviluppo e nella maturazione dei linfociti. Una classificazione di questa famiglia individua una sottofamiglia di TNFR deputati alla trasmissione di segnali apoptotici e per questo chiamati recettori di morte. I recettori di morte comprendono, oltre a Fas, il TNFR1, il TNFR2, il recettore per la linfofosfina, quello per il nerve growth factor (NGF), le molecole CD30, CD27, CD40 e i recettori di TRAIL (*TNF-related- apoptosis-inducing-ligand*).

Il sistema Fas/FasL è il sistema molecolare meglio caratterizzato nello spegnimento della risposta immunitaria. Esso rappresenta uno dei meccanismi attraverso il quale i linfociti con capacità citotossiche uccidono il bersaglio: essi esprimono infatti elevati livelli di FasL che, interagendo con Fas espresso sulla superficie delle cellule bersaglio, innesca la morte cellulare programmata di quest'ultime. Inoltre i linfociti attivati esprimono elevati livelli di Fas e sono sottoposti alla regolazione negativa da parte di linfociti o altri tipi cellulari che esprimono FasL.

Il recettore Fas è costituito da una porzione extracellulare ricca di cisteine, in grado di legare il suo ligando, da una regione transmembrana e da una intra-cellulare, che contiene il *death domain* (DD), che interagendo con la proteina FADD (*Fas Associated Death Domain*) trasduce il segnale di morte. Il legame di Fas con il suo ligando porta alla trimerizzazione del recettore inducendo la formazione del DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*), costituito dall'associazione tra Fas, la molecola adattatrice FADD e la pro-caspasi 8. L'attivazione della caspasi 8 effettiva innesca una cascata proteolitica attivatoria che coinvolge la caspasi 10. Le caspasi 8 e 10 attivano le caspasi esecutrici 3, 7 e 6 (5,6).

L'apoptosi può essere innescata anche attraverso la via intrinseca. Il citocromo c è la molecola chiave di questa via; esso viene rilasciato dal mitocondrio nel citoplasma in seguito alla

depolarizzazione della membrana mitocondriale. Il citocromo c si lega successivamente alla molecola adattatrice Apaf-1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor-1*) che, legando la pro-caspasi 9, porta alla formazione di un complesso detto apoptosoma, il quale induce l'attivazione della caspasi 9 (7,8).

Le caspasi sono proteasi cisteina-dipendenti che attivano il loro substrato per proteolisi a livello di un residuo specifico di acido aspartico. La cascata delle caspasi attiva numerosi effettori che alla fine conducono alla morte cellulare. Tutte le caspasi sono prodotte sotto forma di pro-enzimi inattivi, che vengono attivati mediante l'eliminazione proteolitica della subunità inibitoria: l'attivazione può essere autocatalitica o mediata da un'altra caspasi (9). L'acquisto della sensibilità all'apoptosi da parte dei linfociti T non solo correla con l'espressione di Fas, ma dipende anche dalla *downregulation* di proteine anti-apoptotiche come ad esempio FLIP (*FLICE-inhibitory proteins*). FLIP inibisce l'apoptosi indotta da Fas e da altri recettori di morte modulando l'attività del DISC.

Topi *knock-out* per Fas o Fas ligando sviluppano disordini linfoproliferativi associati ad autoimmunità, suggerendo un ruolo critico della morte cellulare mediata da Fas nelle malattie autoimmuni (10).

In definitiva, l'apoptosi ha lo scopo di impedire che la risposta immunitaria, dopo l'eliminazione dell'antigene, si indirizzi erroneamente contro molecole *self*.

1.2.1 LE MALATTIE AUTOIMMUNI.

Le malattie autoimmuni, fatta eccezione per la tiroidite autoimmune e l'artrite reumatoide, colpiscono circa il 5% della popolazione dei paesi occidentali. Sono il prodotto di un'attivazione dei linfociti T o B in assenza di una causa documentabile, scatenando autoreattività. La perdita della tolleranza al *self* genera risposte immuni verso i propri costituenti antigenici, dando origine a malattie autoimmuni.

Una caratteristica del sistema immunitario è la capacità di regolare la risposta immunitaria; in particolare quando le cellule del sistema immunitario si attivano si ha l'espressione di geni coinvolti nella proliferazione e nelle funzioni effettrici dei linfociti, ma contemporaneamente si induce anche l'espressione dei geni che determinano l'apoptosi della gran parte dei linfociti attivati, fenomeno noto come "*spegnimento della risposta immunitaria*". Questo processo è essenziale per garantire protezione nei confronti dell'autoimmunità: se i linfociti non vanno in apoptosi dopo che gli antigeni *non-self* sono stati eliminati, c'è il rischio che riconoscano per

errore antigeni *self*. Tuttavia una piccola porzione di essi non muore ma permane come cellule memoria, importanti nelle successive stimolazioni da parte dello stesso antigene (11).

L'autoreattività in parte è fisiologica; la sfida è quella di conoscere come questa diventi un processo patologico e come i linfociti T e B contribuiscano alla patogenesi delle malattie autoimmuni. Dal momento che linfociti autoreattivi maturi circolanti sono normalmente presenti nei soggetti sani normali, la loro attività deve essere regolata attraverso meccanismi tollerogenici attivi in periferia.

Un difetto dell'apoptosi può favorire una risposta autoimmune in differenti modi. In primo luogo le cellule apoptotiche esprimono in membrana autoantigeni inusuali per una cellula normale, e il rallentamento della morte cellulare rende questi antigeni *self* più esposti nel tempo. Oppure alterazioni del processo apoptotico possono scatenare fenomeni necrotici che, a differenza dell'apoptosi, determinano la comparsa di reazioni infiammatorie che favoriscono la presentazione di antigeni autologhi al sistema immunitario.

In molti casi i fattori scatenanti che determinano il passaggio da una potenziale autoreattività alla malattia autoimmune sono anche gli agenti infettivi, spesso di tipo virale, i fattori ambientali, il sesso e la perdita delle cellule regolatorie.

Le infezioni possono scatenare la malattia attraverso vari meccanismi: la presenza di antigeni virali simili ad antigeni *self*, può determinare una "cross-reazione" contro il *self*, oppure l'infezione può danneggiare i tessuti causando la liberazione di antigeni normalmente sequestrati, che sono erroneamente riconosciuti come *non self*. Questo errore della risposta immunitaria è considerato uno dei meccanismi alla base dello sviluppo di malattie autoimmuni ed è detto "*mimetismo o mimicria molecolare*". Per esempio nella sindrome di Guillain Barrè è stata dimostrata reattività crociata degli anticorpi verso il lipopolisaccaride di *C. jejuni* e i gangliosidi umani (12).

Anche i fattori ambientali contribuiscono allo sviluppo delle malattie autoimmuni anche se spesso il fattore ambientale scatenante resta ignoto. Inoltre, anche il sesso femminile è un fattore predisponente lo sviluppo di malattie autoimmuni: è stato dimostrato che la produzione massiva di estrogeni nella donna altera alcune funzioni dei linfociti B. Infine, anche alterazioni nel numero e nella funzionalità dei linfociti T regolatori CD4/CD25 positivi contribuiscono all'autoimmunizzazione.

Dal punto di vista clinico le malattie autoimmuni si dividono in sistemiche, come ad esempio la sindrome autoimmune linfoproliferativa e il lupus eritematoso sistemico, e organo-specifiche,

come ad esempio il diabete mellito di tipo1, la sclerosi multipla e la tiroidite di Hashimoto. Dal punto di vista invece del meccanismo immuno-patogenetico si distinguono in malattie mediate da anticorpi, che danno origine a danni tipicamente sistemici, e mediate da cellule, che invece determinano un danno prevalentemente organo o tessuto-specifico.

La maggior parte delle malattie autoimmuni sono multifattoriali, ovvero sono causate dalla combinazione di fattori genetici e di fattori ambientali. Un'adeguata conoscenza dei geni e dei meccanismi funzionali coinvolti nell'autoimmunità permetterebbe di sviluppare terapie e piani di prevenzioni innovativi.

1.2.2 LA SINDROME AUTOIMMUNE LINFOPROLIFERATIVA (ALPS).

La sindrome autoimmune linfoproliferativa, è una malattia autoimmune dell'infanzia, originariamente nota come Sindrome di Canale-Smith (13).

È caratterizzata da un disordine dell'omeostasi dei linfociti causata da un difetto dell'apoptosi, dall'accumulo di linfociti nella milza e nei linfonodi e da espansione clonale di linfociti T doppi negativi (DN) CD4/CD8, TCR $\alpha\beta$ positivi (14,15). Il nostro laboratorio ha identificato un piccolo numero di pazienti, in origine identificati come ALPS, che presentano tutte le condizioni cliniche dei pazienti con ALPS, tranne l'espansione dei linfociti T DN. Successivamente, McKusick propose di usare il termine DALD (*Dianzani's Autoimmune LymphoProliferative Syndrome*) per indicare questi pazienti ed evitare confusione (McKusick VA, OMIM:%605233).

Il tratto principale dei pazienti con ALPS è la linfoproliferazione in combinazione a linfadenopatia e massiva splenomegalia.

La diagnosi di ALPS viene eseguita in base alla presenza di linfadenopatia non maligna, splenomegalia, presenza di linfociti T DN circolanti superiori all' 1%, difetti dell'apoptosi da parte di linfociti attivati *in vitro* (16). Spesso in aggiunta, sono riscontrabili altre malattie autoimmuni, una storia familiare positiva per l'ALPS e mutazioni a carico del gene per Fas (17,18).

L'unico trattamento farmacologico per l'ALPS è la somministrazione di corticosteroidi o altri immunosoppressori anche se, a lungo termine, sono molteplici gli effetti collaterali.

Poiché l'ALPS è stata recentemente identificata non sono disponibili *follow-up* a lungo termine per valutarne la prognosi; tuttavia diversi pazienti sviluppano nel tempo tumori ematologici e severe malattie autoimmune (19).

Fino ad oggi sono state identificate quattro varianti dell'ALPS classificate in base al difetto genetico:

ALPS Ia con mutazioni a carico del gene di Fas,

ALPS Ib con mutazioni a carico del gene di Fas ligando,

ALPS II con mutazioni a carico del gene di caspasi 10 o 8.

Tuttavia ancora sono molti i casi di ALPS in cui non si conosce il difetto genetico, identificati come ALPS III. Recentemente è stata identificata una forma della malattia con mutazioni a carico del gene di N-Ras, denominata ALPS IV (20).

Il modello animale dell'ALPS è rappresentato dai topi MRL *lpr* e *gld*, modello murino dell'autoimmunità, portatori di una mutazione “*loss of function*” in omozigosi, rispettivamente nei geni di Fas e FasL. La tipica mutazione *lpr* è causata da un difetto di splicing e determina una ridotta espressione del recettore in membrana, mentre una variante della mutazione, la forma *lpr*^{cg} è una mutazione puntiforme nel *Death Domain* (DD) del recettore Fas che ne riduce l'attività. La mutazione *gld* è invece una mutazione puntiforme nel dominio C-terminale di FasL che ne riduce la capacità di interagire con Fas (21).

Sulla base di precedenti studi sulle caratteristiche immunologiche dei pazienti con ALPS, si è visto che essi presentano una risposta preferenziale di tipo T-helper 2 con ridotta produzione di IL-2 e IFN- γ e aumentati livelli di IL-4 e IL-5. A questo va aggiunto che in questi pazienti i livelli di IL-10 sono notevolmente aumentati rispetto a quelli di IL-12. IL-10 altera il bilancio Th1/Th2 svolgendo un ruolo da antagonista nello sviluppo dei Th1, favorendo indirettamente la linea Th2 (22).

Nell'ALPS esiste una grande variabilità clinica, non solo tra pazienti con mutazioni differenti, ma anche tra pazienti appartenenti alla medesima famiglia e con la stessa mutazione in Fas. Mutazioni autosomiche recessive sono state descritte in un moderato numero di pazienti con ALPS, nei quali entrambi gli alleli per Fas sono mutati. La forma della malattia associata a eterozigosi spesso è poco chiara dato che l'individuo eterozigote portatore della mutazione non mostra segni clinici. Infatti nell'ALPS-Ia la maggior parte dei pazienti è eterozigote per la mutazione di Fas, ma questo non è sufficiente per lo sviluppo della malattia (23).

L'espressione della malattia quindi, potrebbe dipendere dal tipo e dalla gravità delle mutazioni e/o dalla co-presenza di più alterazioni geniche (24). La variabilità nei meccanismi di eredità fa supporre il coinvolgimento di diversi fattori nell'eziopatogenesi dell'ALPS..

1.3 SAP (Slam Associating Protein): struttura e meccanismo d'azione.

A seguito dell'interazione del TCR con l'antigene, la proliferazione cellulare e la produzione di linfocine sono subordinate ad un secondo segnale co-stimolatorio trasmesso al linfocita da specifici ligandi espressi sulla membrana delle cellule presentanti l'antigene e su quella di altri linfociti. I recettori che trasmettono tali segnali includono i co-recettori del TCR CD4 e CD8, le molecole costimolatorie CD28 e ICOS (25) e i recettori della famiglia di SLAM (Signalling lymphocyte activation molecule).

La famiglia SLAM è costituita da un gruppo di sei recettori transmembrana appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline (SLAM (CD150); 2B4 (CD244), Ly-9 (CD229), NK-T-B (NTB-A o Ly-108), CD84; CRACC) (26,27). Alcuni membri di questa famiglia (fra cui SLAM, NTB-A e CRACC) mediano interazioni omotipiche, mentre altri instaurano interazioni eterotipiche con altre proteine (2B4 il cui ligando è CD48). Quando attivati questi recettori potenziano l'espansione clonale attraverso una via indipendente dall'attivazione di CD28 (25). L'espressione di questi recettori è ristretta alla linea ematopoietica e differisce nei vari tipi cellulari; in particolare SLAM è presente in linfociti attivati T e B, cellule dendritiche, monociti e piastrine (28). SLAM è una glicoproteina di 70 kDa che presenta un dominio extracellulare (in grado di dimerizzare con SLAM presente su cellule vicine) un dominio transmembrana ed uno intracellulare deputato alla trasduzione del segnale.

Studi iniziali sulla traduzione del segnale di SLAM dimostrarono che la sua attivazione indotta da anticorpi agonisti induce proliferazione e produzione di interferone γ (IFN- γ) (29) indipendente dal TCR. Studi in vivo su topi SLAM KO non hanno osservato differenze nella produzione di IFN- γ bensì una ridotta secrezione di IL-4 (30). Da questi esperimenti emerge comunque un modello che vede SLAM come molecola costimolatoria, il cui segnale modula la secrezione di citochine di tipo T_{H1} o T_{H2} (31,32). SLAM partecipa alla sinapsi immunologica in quanto viene reclutato in prossimità del TCR e fosforilato dalle chinasi della famiglia di Src, Fyn e Lck a seguito della stimolazione con anticorpi agonisti del solo TCR (33).

L'attivazione di SLAM con anticorpi agonisti promuove la proliferazione e la produzione di citochine, tra cui di interferone γ (IFN- γ) da parte di linfociti T Helper di tipo uno (T_{H1}), linfociti citotossici (Tc), cellule NK (Natural Killer), anche in assenza della stimolazione del TCR; inoltre converte la risposta dei cloni linfocitari T Helper di tipo due (T_{H2}) verso quella tipica dei feotipi T_{H1} o T Helper tipo zero (T_{H0}) (31).

I recettori della famiglia SLAM una volta fosforilati reclutano in membrana l'adattatore molecolare specifico SAP.

SAP (Slam Associating Protein, chiamato anche SH2D1A: Src Homology 2 Domain 1A containing protein), è una piccola proteina di 15 kDa costituita da un dominio SH2 e da una corta coda di 28 aminoacidi all'estremità C-terminale che presenta due tirosine fosforilabili (34). Il gene che codifica per SAP mappa nella regione cromosomica Xq25-q26; è costituito da quattro esoni e si estende per una regione di 25Kb. Mutazioni a carico di SAP sono evidenziate nella sindrome di Duncan (XLP: X-linked lymphoproliferative disease) (35), disordine immunologico ereditario, caratterizzato da una aumentata e disorganizzata risposta immune in seguito ad infezione fulminante da EBV (Epstein Barr Virus). In pazienti affetti da XLP il gene SAP presenta mutazioni che portano ad una completa perdita del gene o variazioni missenso che causano un arresto prematuro della sintesi proteica e/o una proteina non funzionale (36). La malattia è quasi asintomatica in assenza di infezione da EBV, anche se a lungo termine diventano evidenti la linfoproliferazione, la disgammaglobulinemia e alcuni fenomeni autoimmuni (37). Si pensa che questa sintomatologia corrisponda ad una generale perdita di regolazione della componente T-helper (in particolare sarebbe carente la risposta T_{H2} in favore della risposta T_{H1}) della risposta immunitaria e che tale disordine diventi manifesto a seguito dell'infezione dei linfociti B con EBV con conseguente linfoproliferazione e danni sistemici spesso letali in età pediatrica (37,38). I linfociti di pazienti XLP mostrano infatti un deficit di proliferazione, di sintesi di IL-2, di espressione di CD25 e di aggregazione omotipica in seguito a stimolazione combinata del TCR e del CD28 (39). Inoltre i linfociti CD4+ da pazienti XLP esprimono meno ICOS e producono una quantità ridotta di IL-10, suggerendo che questi deficit siano la causa del mancato switch isotipico dei linfociti B e dell'ipogammaglobulinemia osservati negli stessi pazienti (40). Mutazioni del gene sono state riscontrate anche in pazienti affetti da immunodeficienza comune variabile (CVID) e da linfostiocitosi emofagocitica (FLH). Mentre SAP è espresso prevalentemente nei linfociti T, nelle cellule NK, negli eosinofili ed in alcune cellule B, il suo ruolo in macrofagi è delegato alla proteina omologa EAT-2. SAP ed EAT-2, che rappresentano gli interattori principali della famiglia dei recettori SLAM, condividono un meccanismo simile di riconoscimento ed interazione con la propria sequenza consenso ma, mentre il legame di EAT-2 al recettore avviene solamente quando le tirosine sono fosforilate, SAP esibisce la peculiare capacità di associare a SLAM (CD150) ma non agli altri recettori della famiglia, anche in assenza di fosforilazione (41). SAP può associarsi grazie al suo dominio SH2 ad ognuno dei tre siti consensus presenti su SLAM e in

LINFOCITA T

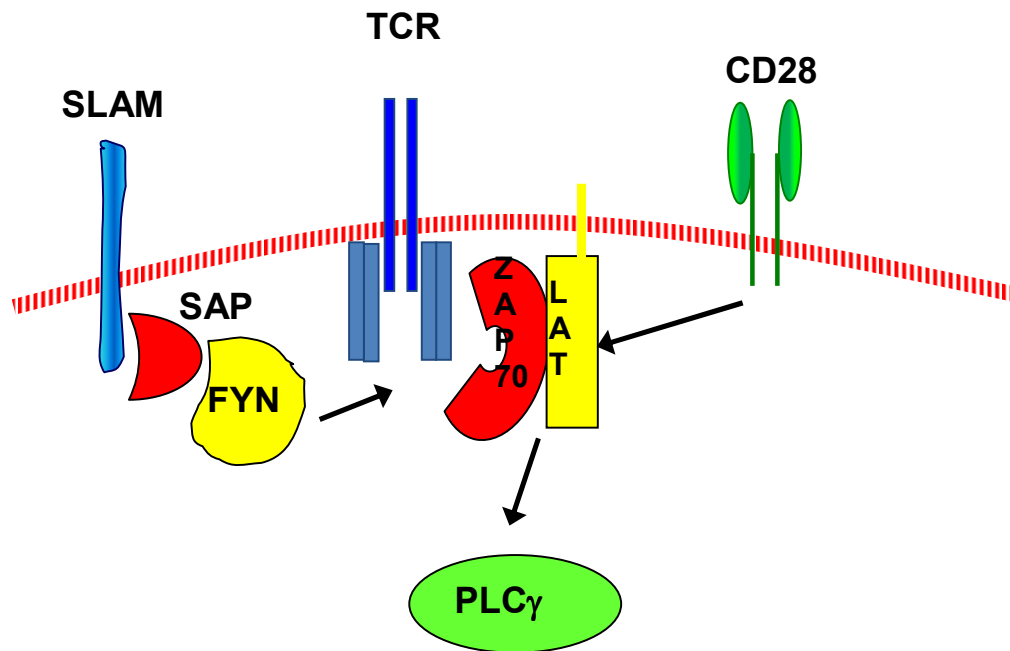


Figura 1: Modello di trasduzione del segnale in seguito all'interazione tra SLAM-SAP.

particolare può legare i motivi contenenti le tirosine 307 e 327 se fosforilate e il motivo contenente la tirosina 281 anche in assenza di fosforilazione (33,42). Inoltre, SAP è in grado di legare contemporaneamente la tirosina chinasi Fyn, che è richiesta per l'attivazione di SLAM (43,44,45). Nel linfocita quiescente è presente quindi un complesso stabile SLAM/SAP/FYN che in seguito alla stimolazione con anticorpi agonisti si modifica promuovendo la fosforilazione delle ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif) ed il reclutamento di altri effettori come l'inositolo fosfatasi SHIP-1, gli adattatori Shc, Dok1 e Dok2 e scambiatori guaninici come RasGAP (38,32,46). Questo complesso multiproteico promuove la produzione di citochine in associazione con il segnale generato dal TCR: infatti le vie di trasduzione del segnale utilizzate dai membri della famiglia di SLAM e dal TCR si sovrappongono e si rinforzano ampiamente per generare un'appropriata risposta immune (**Figura 1**).

Esistono alcune evidenze secondo le quali i recettori della famiglia SLAM potrebbero mediare la loro funzione anche in assenza di SAP: (i) nei macrofagi SAP non è espresso e la sua presunta funzione verrebbe ricoperta da EAT-2 che è però privo del dominio con cui SAP attiva Fyn; (ii) è stato osservato che il reclutamento di 2B4 attraverso anticorpi, in cellule NK di pazienti affetti da

XLP, inibisce la citotossicità NK mediata; (iii) altri recettori della famiglia SLAM sono in grado di associare a proteine come SHP-2 e di mediare specifici segnali biochimici come l'attivazione di Akt anche in assenza di SAP (34).

1.3.1 SAP E L'AUTOIMMUNITA'

Anche se non è ancora del tutto chiarito il ruolo della molecola nell'autoimmunità dati in letteratura hanno descritto il suo coinvolgimento in alcune malattie autoimmuni.

L'aumentata espressione di SLAM in linfociti T provenienti da liquido sinoviale di pazienti affetti da artrite reumatoide può contribuire ad alterare il profilo citochinico incrementando la produzione di IL-10, IFN γ e TNF α , intervenendo, quindi, nel processo autoimunitario.(47)

E' stato dimostrato ,inoltre, un aumento dell'espressione di cellule T presentanti SLAM in pazienti affetti da sclerosi multipla; anche se il contributo allo sviluppo della patologia è ancora da chiarire.

Peng et al. hanno dimostrato che SAP è upregolato in linfociti di topi affetti da lupus eritematoso sistemico (LES); topi con un deficit di SAP in cui è stata indotta la malattia non sviluppano la sintomatologia anche se le funzioni globali dei linfociti T vengono mantenute, per questo motivo sono suscettibili allo sviluppo dell'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE). (48)

Questi dati hanno suggerito un possibile ruolo di SAP in una malattia autoimmune, come ad esempio l'ALPS, in quanto in questi pazienti è riscontrata un'elevata produzione di IL-10 nel siero e lo sviluppo di altre patologie autoimmuni.

2. SCOPO DEL LAVORO.

La sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS) è una malattia geneticamente eterogenea. Alla base vi è il deficit funzionale della via di trasduzione Fas-mediata e tra i fattori genetici che concorrono allo sviluppo della malattia, vi sono mutazioni nei geni che codificano per Fas (ALPS Ia), FasL (ALPS Ib) e caspasi 10 (ALPS II), tuttavia altri geni "modificatori" possono concorrere allo sviluppo della patologia ad esempio, l'alterazione genetica nei pazienti ALPS III non è stata ancora identificata. Le mutazioni note sono presenti, in genere, in eterozigosi, vengono ereditate da un genitore sano e pertanto non sono in grado da sole di portare allo stato conclamato della sindrome. Il concorso di mutazioni in altri geni è suggerito dal fatto che il genitore privo della mutazione presenta anch'esso un difetto nell'apoptosi mediata da Fas.

Durante la ricerca di mutazioni nei geni noti nei pazienti ALPS, abbiamo trovato una associazione significativa tra alcuni polimorfismi nel promotore del gene SAP e i pazienti. Questa associazione non è mai stata descritta in letteratura. Scopo di questo lavoro è quindi lo studio genetico e la caratterizzazione funzionale di questi polimorfismi.

3.MATERIALI E METODI

3.1 PAZIENTI

Nel nostro studio abbiamo analizzato 27 pazienti con ALPS e 61 controlli sani, etnicamente correlati, provenienti dal Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università del Piemonte Orientale. I prelievi di sangue periferico sono stati ottenuti da pazienti e controlli sotto consenso informato. Lo studio è stato effettuato secondo le linee guida del comitato etico locale

3.2 ESTRAZIONE DI DNA DA SANGUE.

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

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

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

3.3 MISURAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI ALLO SPETTROFOTOMETRO

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

50 µg/ml corrispondono a 1 O.D._{260 nm} per il DNA

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

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

3.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Il promotore del gene SAP è stato amplificato da campioni di DNA genomico estratto da pazienti e da controlli sani. Il frammento di dimensioni pari a 1300 bp, è stato amplificato utilizzando 100-300 ng di DNA con i primers descritti in **Tabella 1**.

	PRIMERS
SAP SeqF1	F:5'-aacagattttatggacaaaat-3'
SAP SeqR1	R:5'-agaggggaggaacattggaa-3'

Tabella 1. Primers utilizzati per amplificare il promotore di SAP; (F=forward; R=reverse).

La miscela di reazione è composta dal tampone di reazione (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0,5 µM di ciascun oligonucleotide, 0,2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi, e 1U Taq DNA polimerasi (5U/µl) (Invitrogen). Le reazioni di PCR necessitano per avvenire di MgCl₂: esso è concentrato 1.5 mM nella reazione di amplificazione. Le condizioni di reazione sono le seguenti:

94°C 5'

94°C 30''
65°C 30''(-0.5°C)
72°C 45'' } 20 cicli

94°C 30''
58°C 30''
72°C 45'' } 25 cicli
72°C 10'

3.5 ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO

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

3.6 SEQUENZIAMENTO AUTOMATICO

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

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

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

Il prodotto della reazione è stato purificato, al fine di eliminare gli oligonucleotidi non incorporati, mediante il kit Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup (Montage). 5 µl del purificato sono stati addizionati a 10 µl di formammide, denaturati (3' a 95°C), e caricati su piastra ottica per la successiva analisi al sequenziatore.

3.7 SEPARAZIONE SU GRADIENTE DI CELLULE MONONUCLEATE DA SANGUE PERIFERICO (Ficoll).

Per la separazione di cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC: Perypheral Blood Mononuclear Cell), è stato utilizzato sangue di controlli sani.

Il sangue è stato diluito con PBS, stratificato su 10 ml di Lympholyte (Cederlane Laboratories Hornby, Ontario, Canada) e centrifugato a 1800 rpm per 30 minuti .

In seguito sono stati recuperati i PBMC, lavati con PBS e centrifugati una seconda volta a 1500 rpm per 10 minuti.

Le cellule sono state risospese in terreno RPMI 1640 (Gibco, New York, USA) addizionato di 1% L-Glutammina, Antibiotici (Penicillina, Streptamicina, Gentamicina) e 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco, New York, USA). Le cellule sono state contate mediante colorante Blu di Tripano.

3.8 RT-PCR e REAL-TIME

Per gli esperimenti di Real Time è stato isolato l'RNA totale da colture di PBMC stimulate con PHA 1µg/mL per diversi tempi, utilizzando un kit commerciale Nucleospin RNAII (Machery-Nagel, Germany). L'RNA (500ng) è stato retrotrascritto con il kit ThermoscriptTM RT PCR System (Invitrogen, Burlington, ON Canada). L'espressione di SAP è stata valutata con un saggio di espressione genica Assay on Demand (Applied Biosystem (Assay No. Hs99999139_m1 e Assay No. Hs001677093_m1 rispettivamente). Il gene housekeeping GAPDH (Assay No.Hs99999905_m1) è

stato utilizzato per normalizzare le variazioni del cDNA. La reazione di Real Time è stata condotta nello strumento 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem), ogni campione è stato analizzato in duplicato impiegando 2 µl di cDNA diluito, 10 µl di PCR master mix (Applied Biosystem) e 1 µl di Assay on Demand mix. Il ciclo di PCR utilizzato prevede 10 min a 95C, seguiti da 40 cicli a 95C per 15 sec e a 60C per 1 min. I risultati sono stati analizzati con il metodo delle curve standard.

3.9 ANALISI STATISTICA

L'analisi della distribuzione dei polimorfismi e degli aplotipi nelle popolazioni è stata fatta con il test del χ^2 . I valori di p sono stati calcolati tenendo conto di tutti i parametri necessari. La distribuzione dei genotipi è stata analizzata con il test del Chi quadro o Fisher. Tutti i valori assunti dalle p avevano due code (cut-off $P < 0,05$). Per l'analisi degli aplotipi è stato utilizzato il software haploview. Il test impiegato per paragonare i risultati ottenuti è stato il test non parametrici Mann-Whitney U-test. Tutti i valori assunti delle p avevano due code.

4. RISULTATI

4.1 RICERCA DI VARIAZIONI NEL GENE DI SAP IN PAZIENTI CON ALPS.

Il gene che codifica per SAP mappa nella regione cromosomica Xq25-q26; è costituito da quattro esoni e si estende per una regione di 25Kb.

La regione del DNA corrispondente al promotore e ai quattro esoni di SAP è stata amplificata mediante PCR e sottoposta ad analisi tramite sequenziamento diretto per cercare mutazioni e polimorfismi noti e non noti, inizialmente, in 27 pazienti con ALPS.

I risultati del sequenziamento non hanno evidenziato nessuna mutazione, ma solo tre polimorfismi (-631 G/A; -494 G/A; -346 C/T) già noti (<http://snpper.chip.org>) situati nella regione del promotore (**Tabella 2**).

Un' analisi in silico e della letteratura ha evidenziato che queste tre variazioni non modificano siti di legame di fattori trascrizionali, ma la variazione -346 C/T appare di interesse in quanto è localizzata in un possibile sito di metilazione e potrebbe pertanto modificare l'espressione del gene (49).

*POSIZIONE NUCLEOTIDE	SNP id	LOCALIZZAZIONE	ALLELI
-631	rs990545	PROMOTORE	G/A
-494	rs7357894	PROMOTORE	G/A
-346	rs12164382	PROMOTORE	C/T

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

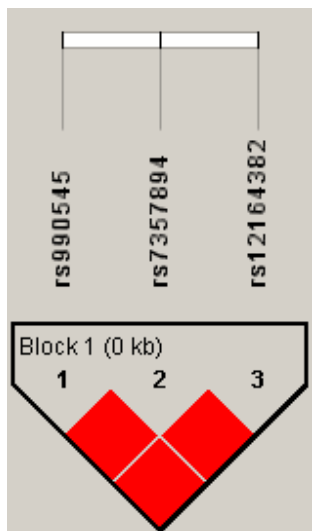
Tabella 2: Polimorfismi del promotore del gene di SAP descritti in letteratura.

Pertanto abbiamo esteso l'analisi a 61 controlli sani per valutare se la frequenza di questo polimorfismo fosse diversa nei pazienti e nei controlli, un dato che suggerirebbe un suo possibile coinvolgimento nella malattia. La frequenza dell'allele -346T era maggiore nei pazienti che nei controlli (52% vs 28% $p=0.0037$). L'analisi delle frequenze genotipiche ha poi dimostrato che lo stato omozigote (femmine) o emizigote (maschi) per l'allele -346T è significativamente più frequente nei pazienti rispetto ai controlli (44% vs 15% $p=0.006$) e aumenta di quasi 5 volte il rischio di sviluppare la malattia (**Tabella3**).

VARIAZIONE NUCLEOTIDICA	GENOTIPI	ALPS		CONTROLLI	
		N°	%	N°	%
SNP -346C/T	CC	11	(41)	36	(59)
	CT	4	(15)	16	(26)
	TT	12	(44)	9	(15)
p=0.006 OR=4.62 IC=4.16-14.92					

Tabella 3: Frequenze genotipiche della variazione -346 C/T in pazienti ALPS e controlli

Abbiamo quindi valutato se lo SNP -346C/T fosse in linkage disequilibrium con gli altri due SNPs del promotore utilizzando un software statistico (Haploview) che calcola le possibili combinazioni aplotipiche in base ai dati ottenuti dal sequenziamento. I risultati indicano che i tre SNP si possono associare in quattro aplotipi (1, 2, 3 e 4) che rappresentano circa il 99% delle possibili combinazioni aplotipiche (**Tabella 4**).



A

APLOTIPO	-631 G/A	-494 G/A	-346 C/T
1	G	A	C
2	A	G	T
3	G	G	C
4	A	G	C

B

Tabella 4:

A: Linkage disequilibrium tra i polimorfismi del promotore di SAP.

B: Combinazioni aplotipiche in pazienti e controlli.

Le frequenze di questi aplotipi nei controlli e nei pazienti sono mostrati nella Tabella 5. L'aplotipo 2, caratterizzato in modo esclusivo dallo SNP -349T, risulta essere più frequente nei pazienti mentre gli aplotipi 1 e 3 nei controlli; l'aplotipo 4 ha una frequenza relativamente bassa in entrambe le popolazioni (**Tabella5**).

APLOTIPO	PAZIENTI ALPS		CONTROLLI	
	N	%	N	%
1	17	31	61	50
2	28	52	34	28
3	8	15	23	19
4	1	2	4	3
Overall= 0.022				

Tabella 5. Frequenze aplotipiche.

Il passo successivo sarà quello di valutare se i diversi aplotipi possano influenzare l'espressione genica di SAP.

Esperimenti preliminari per valutare l'espressione dei livelli del trascritto di SAP sono stati effettuati su lisati cellulari di PBMC ottenuti da donatori sani portatori di diversi aplotipi, stimolati con PHA 1µg/mL al T0, T2 e T4.

I dati ottenuti in real time PCR dimostrano che dopo 72 ore vi è una significativa diminuzione dei livelli del trascritto ($p < 0.0001$); successivamente dopo 96 ore i livelli del trascritto tendono a rialzarsi lievemente (**Figura 2**).

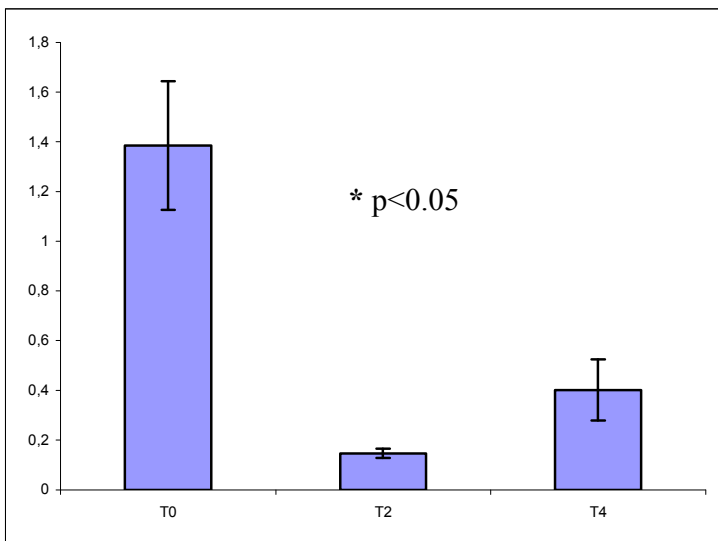


Figura2: Livelli trascrizionali di SAP dopo stimolazione con PHA1µg/ml in colture di PBMCs. I livelli di mRNA di SAP sono stati valutati in Real Time PCR al T0 T2 e T4 di stimolazione e normalizzati rispetto al gene della GAPDH. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann Whitney.

5. DISCUSSIONE

SAP (Slam Associatine Protein, chiamato anche SH2D1A), è una piccola proteina di 15kDa costituita da un dominio SH2 e da una corta coda di 26 aminoacidi all'estremità C-terminale che presenta due tiroxine fosforilabili (34). Mentre SAP è espresso prevalentemente nei linfociti T, nelle cellule NK, negli eosinofili ed in altre cellule B, il suo ruolo in macrofagi è delegato alla proteina omologa EAT-2 (38). SAP ed EAT-2 che rappresentano gli interattori principali della famiglia dei recettori SLAM, condividono un meccanismo simile di riconoscimento ed interazione con la propria sequenza consenso, ma mentre il legame di EAT-2 al recettore avviene solamente quando le tiroxine sono fosforilate, SAP esibisce la peculiare capacità di associare a SLAM (CD 150) ma non agli altri recettori della famiglia, anche in assenza di fosforilazione (841). SAP può associarsi grazie al suo dominio SH2 ad ognuno dei tre siti consensus presenti su SLAM e in particolare può legare i motivi contenenti le tirosine 307 e 327 se fosforilate e il motivo contenente la tirosina 281 anche in assenza di fosforilazione (39,42). Inoltre, SAP è in grado di legare contemporaneamente la tirosina chinasi Fyn, che è richiesta per l'attivazione di SLAM (43,44,45). Nel linfocita quiescente è presente quindi un complesso stabile SLAM/SAP/FYN che in seguito alla stimolazione con anticorpi agonisti si modifica promuovendo la fosforilazione delle ITSM ed il reclutamento di altri effettori come l'inositolo fosfatasi SHIP-1, gli adattatori Shc, Dok1 e Dok2 e scambiatori guaninici come RasGAP (38,32,46). Questo complesso multiproteico promuove la produzione di citochine in associazione con il segnale generato dal TCR: infatti le vie di trasduzione del segnale utilizzate dai membri della famiglia di SLAM e dal TCR si sovrappongono e si rinforzano ampiamente per generare un'appropriata risposta immune.

L'importanza della segnalazione generata da SLAM e SAP nella regolazione della risposta immunitaria è emersa con l'identificazione di mutazioni di SAP in circa il 60% dei casi di XLP,(35) disordine immunologico ereditario, caratterizzato da una aumentata e disorganizzata risposta immune in seguito ad infezione fulminante da EBV (Epstein Barr Virus). Mutazioni a carico del gene che codifica SAP sono state riscontrate in altre patologie; ad esempio Eastwood et al. associa una variazione nell'esone uno di SAP in pazienti CVID, che trovandosi in un sito di splicing altera l'espressione della proteina.

Anche se non è ancora del tutto chiarito il ruolo della molecola nell'autoimmunità dati in letteratura hanno descritto il suo coinvolgimento in alcune malattie autoimmuni. La sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS) è una malattia geneticamente eterogenea (19,20). Alla base vi è il deficit funzionale della via di trasduzione Fas-mediata e tra i fattori genetici che concorrono allo sviluppo

della malattia, vi sono mutazioni nei geni che codificano per Fas (ALPS Ia), FasL (ALPS Ib) e caspasi 10 (ALPS II), tuttavia altri geni “modificatori” possono concorrere allo sviluppo della patologia ad esempio, l’alterazione genetica nei pazienti ALPS III non è stata ancora identificata. Le mutazioni note sono presenti, in genere, in eterozigosi, vengono ereditate da un genitore sano e pertanto non sono in grado da sole di portare allo stato conclamato della sindrome. Il concorso di mutazioni in altri geni è suggerito dal fatto che il genitore privo della mutazione presenta anch’esso un difetto nell’apoptosi mediata da Fas.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare se polimorfismi o mutazioni presenti nella regione codificante e nel promotore del gene SAP potessero essere coinvolti nello sviluppo della malattia..

Il gene che codifica per SAP mappa nella regione cromosomica Xq25-q26; è costituito da quattro esoni e si estende per una regione di 25Kb.

La regione del DNA corrispondente al promotore e agli esoni di SAP è stata amplificata mediante PCR e sottoposta ad analisi tramite sequenziamento in 27 pazienti con ALPS; i risultati del sequenziamento non hanno evidenziato nessuna mutazione ma solo tre polimorfismi (-631 G/A; -494 G/A; -346 C/T) , già presenti in banca dati (<http://snpper.chip.org>), situati nella regione del promotore.

Un’analisi in silico e della letteratura ha evidenziato che queste tre variazioni non modificano siti di legame di fattori trascrizionali, ma la variazione -346 C/T appare di interesse in quanto è localizzata in un possibile sito di metilazione e potrebbe pertanto modificare l’espressione del gene (49). La metilazione è una modificazione epigenetica del DNA che altera l’accessibilità fisica al genoma da parte di complessi molecolari deputati all’espressione genica. Questa variazione potrebbe legare o inibire il legame con fattori di trascrizione e modulare, di conseguenza, l’espressione della proteina.

L’analisi è stata, quindi, ampliata anche su 61 controlli sani per valutare se la frequenza di questo polimorfismo fosse diversa nelle popolazioni di controlli e di pazienti suggerendo un coinvolgimento nella suscettibilità alla malattia.

La frequenza dell’allele -346T era maggiore nei pazienti che nei controlli (52% vs 28% $p=0.0037$). L’analisi delle frequenze genotipiche ha poi dimostrato che lo stato omozigote (femmine) o emizigote (maschi) per l’allele -346T è significativamente più frequente nei pazienti rispetto ai controlli (44% vs 15% $p=0.006$) e aumenta di quasi 5 volte il rischio di sviluppare la malattia

Abbiamo quindi valutato se il polimorfismo -364C/T fosse linkage disequilibrium con gli altri due SNPs. Per confermare questa associazione abbiamo utilizzato un software statistico (Haploview) che calcola le possibili combinazioni aploipiche in base ai dati ottenuti dal sequenziamento .

I risultati del programma indicano quattro aplotipi (1, 2, 3 e 4) che rappresentano circa il 99% delle possibili combinazioni aplotipiche. L'aplotipo 2, caratterizzato in modo esclusivo dallo SNP -349T, risulta essere più frequente nei pazienti mentre gli aplotipi 1 e 3 nei controlli; l'aplotipo 4 ha una frequenza relativamente bassa in entrambe le popolazioni.

Il passo successivo sarà quello di valutare se i diversi aplotipi possano influenzare l'espressione genica di SAP.

Esperimenti preliminari per valutare l'espressione dei livelli del trascritto di SAP sono stati effettuati su lisati cellulari di PBMC ottenuti da donatori sani portatori di diversi aplotipi, stimolati con PHA 1µg/mL al T0, T2 e T4.

I dati ottenuti in real time PCR dimostrano che dopo 72 ore vi è una significativa diminuzione dei livelli del trascritto ($p < 0.0001$); successivamente dopo 96 ore i livelli del trascritto tendono a rialzarsi lievemente.

In futuro si pensa di aumentare la casistica dei controlli, per confermare il dato genetico; valutare l'espressione dei livelli proteici di SAP tramite Western blotting e aumentare gli esperimenti in Real Time PCR per valutare i livelli di trascritto di SAP. In terza analisi si pensa di approfondire lo studio sulla metilazione del polimorfismo -346 C/T.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Nat R., E. Radu, T. Regalia and L. M. Popescu Apoptosis in the immune system: Fas-induced apoptosis in monocytes-derived human dendritic cells. *J. Cell. Mol. Med.*, 2002; 6:223-234.
2. Peng Y., Martin D., Kenkel J., Zhang K., Ogden C., and Elkon K. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells, *J Autoimm.*, 2007; in press.
3. Ashkenazi A., Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998; 281:1305-1308.
4. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien, RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*, 2000; 288:2354-2357.
5. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 1997; 88:355-36.
6. Los M, C. Stroh, R. U. Janiche, I. H. Engels, K. Schulze-Osthoff Caspases: more than just killers? *Trends in Immunology*, 2001 22:

7. Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312, 1998.
8. Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssiere J.C., Mignotte B.: The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.*, 1995; 9:277-1287.
9. Kumar S. Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Diff.* 6, 1060-1066, 1999.
10. Rieux-Laucat F., F. Le Deist and A. Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death and Differentiation Nature* 2003; 10:124-133.
11. Tsonis IA, Avrameas S, Moutsopoulos HM. Autoimmunity and pathophysiology. *J. Autoimmun.* 2007 [Epub ahead of print]
12. Kuijf ML., Godschalk PC., Gilbert M., Endtz HP., Tio-Gillen AP., Ang CW., van Doorn PA. And Jacobs BC Origin of ganglioside complex antibodies in Guillan-Barrè syndrome. *J. Neuroimmunol.*, 2007;2:69-73.
13. Canale VC, Smith CH. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr.* 1967;70:891-899.
14. Straus S. E., M. Sneller, M. J. Lenardo, J. m. Puck and W. Strober An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Annals of Internal Medicine*, 1999;130:591-601.
15. Bleesing J. J. H., M. R. Brown, S. E. Straus, J.K Dale, R. M. Siegel, M. Jonhson, M.J. Lenardo, J.M. Puck and T. A. Fleisher, Immunophenotypic profiles in family with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*, 2001,98:2466-2473.
16. Lopatin U., R. K. Williams, J. J. H. Bleesing, J. K. Dale, D. Wong, J. T. Feldstein, S, Fritz, M. R: Morrow, I. Fuss, M. C. Sneller, M. Raffeld T. A. Fleisher, J. M. Puck W. Strober, E. S. Jaffe and S. S. E. Straus Increases in circulating and lymphoid tissue interleukin-10 in autoimmune lymphoproliferative syndrome are associated with diseases expression. *Blood*, 2001,97:3161-3170.
17. Campagnoli M.F., L. Garbarini, P.Quarello, E. Garelli, A. Carando, V. Baravalle, A, Doria, A, Biava, A. Chiocchetti, A. Rosolen, C. Dufur, U. Dianzani and U. Ramenghi The broad spectrum of autoimmune lymphoproliferative disease: molecular bases, clinical features and long-term follow-up in 31 patients. *Haematologica*, 2006;91:538-541.
18. Martin D.A., L. Zheng, R. M. Siegel, B. Huang, G.H. Fisher, J. Wang, C.E: Jackson, J.M. Puck, J. Dale, S. E. Straus, M. E. Peter, P. H. Krammer, S. Fesik and M.J, Lenardo Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia *PNAS*; 1999,96: 4552-4557.
19. A. van den Berg, E. Maggio, A. Diepstra, D. de Jong, J. van Krieken and S. Poppema Germline Fas gene mutation in a case of ALPS and NLP Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2002;99:1492-1494.

20. Oliveira JB, N. Bidere, JE. Niemela, L. Zheng, K. Sakai, CP. Nix, RL. Danner, J. Barb, PJ. Munson, JM. Puck, J. Dale, SE. Straus, TA. Fleisher and MJ. Lenardo NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome *PNAS*, 2007; 21:8953-8958.
21. Benihoud K, Bonardelle D, Bobe P, Kiger N. MRL/lpr CD4- CD8- and CD8+ T cells, respectively, mediate Fas-dependent and perforin cytotoxic pathways. *Eur J Immunol.*, 1997; 27:415-420.
22. Renkl AC, Wussler J, Ahrens T, Thoma K, Kon S, Uede T, Martin SF, Simon JC, Weiss JM Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype. *Blood*. 2005 Aug 1;106(3):946-55. Epub 2005 Apr 26.
23. Jackson C. E., R. E. Fischer, A.P Hsu, S. M. Anderson, Y. Choi, J. Wang, J.K Dale, T. A. Fleisher, L.A. Middleton, M. C. Sneller, M.J. Lenardo, S. E. Straus and J.M. Puck Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance *Am. J. Hum. Gen.* 1999,64:1002-1014.
24. Ramenghi U., S. Bonisconi, g. Migliaretti, S. DeFranco, F. Bottarel, C. Gambaruto, D. DiFranco, R. Priori, F. Conti, I. Dianzani, G. Valesini, F. Merletti and U. Dianzani Deficient of apoptosis pathway without fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. *Blood*, 2000;95,3176-13182.
25. Veillette A. (2006) *Nat Immunol* **6**, 56-66
26. Veillette A., S. Latour (2003) *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 277–285
27. Engel P., Eck M.J., Terhorst C., (2003) *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 813–821
28. Nanda N., Andre P., Bao M., Clauser K., Deguzman F., Howie D., Conley P.B., Terhorst C., Phillips D.R. (2005) *Blood.*, **106**, 3028-3034
29. Cocks B.G., Chang, C., Carballido J.M., Yssel H., de Vries J.E, Aversa G (1995) *Nature* **376**, 260-263
30. Wang N., Satoskar A., Faubion W., Howie D., Okamoto S., Feske S., Gullo C., Clarke K., Roriguez Sosa M., Sharpe A., Terhorst C. (2004) *J Exp Med* **199**, 1255–1264
31. Veillette A. Dong Z., Latour S. (2007) *Immunity* **27**, 698-708
32. Latour S., Veillette A (2003) *Immun Rev* **192**, 212-224
33. Howie D., Simarro M., Sayos J., Guirado M., Sancho J., Terhorst C. (2002) *Blood* **99**, 957-965.
34. Veillette A. (2004) *J Exp Med.* **199**, 1175-1178
35. Howie D., Sayos j., Terhorst C., Morra M. (2000) *Curr Opin Immunol* **12**, 474–478

36. Morra M., Lu J., Poy F., Martin M., Sayos J., Calpe S., Gullo C., Howie D., Rietdijk S., Thompson A., Coyle A. J., Denny C., Yaffe M. B., Engel P., Eck M. J., Terhorst C. (2001) *EMBO J* **20**, 5840-5852
37. Nichols K. E., Ma C. S., Cannons J. L., Schwartzberg P. L., Tangye S. G. (2005) *Immunol Rev* **203**, 180-199
38. Ma C.S., Nichols K.E., Tangye S.G. (2007) *Annu Rev Immunol* **25**, 337-379
39. Sanzone S., Zeyda M., Saemann M.D., Soncini M., Holter W., Fritsch G., Knapp W., Condotti F., Stulnig T.M., Parolini O. (2003) *J Biol Chem* **278**, 29593-29599
40. Ma C.S., Hare N.J., Nichols K.E., Dupré L., Andolfi G., Roncarolo M., Adelstein S., Hodgkin P.D. Tangye S.G. (2005) *J Clinical Inv*, **115**, 1049-1059
41. Howie D., Simarro M., Sayos J., Guirado M., Sancho J., Terhorst C. (2002) *Blood* **99**, 957-965.
42. Hwang P. M., Li C., Morra M., Lillywhite J., Muhandiram D. R., Gertler F., Terhorst C., Kay L. E., Pawson T., Forman-Kay J. D., Li S. C. (2002) *EMBO J* **21**, 314-23
43. . Latour .S., Gish G., Helgason C.D., Humphries R.K., Pawson T., Veillette A. (2001) *Nature Immunol* **2**, 681-690
44. Latour .S., Roncagalli R., Chen R.,Bakinowski M., Shi X., Schwartzberg P.L., Davidson D., Veillette A. (2003) *Nat Cell Biol* **2**, 149-154
45. Cannons J.L., Yu L.J., Hill B., Mijares L.A., Dombroski D., Nichols K.E., Antonellis A., Koretzky G.A., Gardener K., Schwartzberg P.L. (2004) *Immunity* **21**, 693-706
46. Sylla B.S., Murphy K., Cahir-McFarland E, Lane W.S., Mosialos G., Kieff E. (2000) *Proc Nat Acad Sci USA* **97**, 7470-7475
47. Peng L., Target identification and validation in systemic autoimmunity. *ImmunolRes.*2005;32(13):2019.
48. Chan AY, Westcott JM, Mooney JM, Wakeland EK, Schatzle JD. The role of SAP and the SLAM family in autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2006 Dec;18(6):656-64. Epub 2006 Sep 29.
49. Parolini O.,Weinhausel A., Kagerbauer B., Sassmann J., Holter W., Gadner H., Haas O., Knapp W. Differential methylation pattern of the X-linkd lymphoproliferative (XLP) disease gene SH2 D1A correlates with the cell lineage-specific trascription. *Immunogenetics* 2003 55:116-121

SEMINARI INTERNI AL DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

Anno Accademico 2007/08

- Human Papilloma Viruses loads and its association with non melanoma skin cancer
Dott. S. Weissenbrau 19-12-2007

Biologia molecolare e genetica in ambito forense, principali applicazioni e sviluppo delle nuove tecniche

Dott. G. Portera 14/1/2008

- K⁺ channels in the heart: in and out of control
Dr. R. Radicke 21-1-2008

- Integrin trafficking and tumor cells invasiveness
Dott. J. Norman 23/1/2008

- La microscopia a forza atomica nella ricerca biomedica: dalle immagini alle interazioni
Prof. M. Ruspanti 24-1-2008

- Metodi e applicazioni delle nuove tecnologie di sequenziamento ultramassivo
Dott. G. De Bellis 6/2/2008

- La proteina HMGB1 e un segnale di danno tissutale
Prof. ME. Bianchi 7/2/2008

- New treatment strategies for multiple mieloma
Prof. A. Palombo 21/2/2008

- Caratterizzazione molecolare della leukemia linfatica cronica
Prof. V. Gattei 28/2/2008

- Analytic vaccinology and human cytomegalovirus human monoclonal antibodies as tool to identify novel antigens for protective vaccination

Dott. A. Maccagno 5/3/2008

- Applications of gene expression profile to cancer research
Prof. E. Medico 6/3/2008

- Fatty liver preservation against ischemia reperfusion injury
Dott. JR. Catafau 7/3/2008

- Il sistema Ghrelin aspetti endocrini e metabolici
Prof. F. Broglio e Prof. C. Gauna 13/3/2008

- To repress gene expression just take out vinegar role of the class 2 histone deacetylase HDAC4
Prof. C. Brancolini 13/3/2008

- Immunologia della psoriasi
Prof. G. Girolomoni 20/3/2008

- Mutazioni del gene dell'insulina come causa di diabete neonatale/infantile un nuovo esempio da malattia da misfolding
Prof. F. Barbetti 3/4/2008

- Modificazioni del metabolismo del ferro nella risposta infiammatoria
Prof. G. Cairo 9/4/2008

- Interazione tra tumori e sistema immunitario nella leucemia linfatica cronica il ruolo della via metabolica del mevalonato
Prof. M. Massaia 14/4/2008

- The herpesvirus DNA polymerases a model for new antiviral drug discovery
Prof. G. Palu 16/4/2008

- Epidemiologia dell'infezione HPV e del cancro della cervice uterina un modello dinamico
Dr. J. Bussano 17/4/2008

- Ghrelin e pancreas endocrine
Prof. R. Granata 24/4/2008

- The mechanisms of cell infection with hepatitis C virus- novel potential targets for therapeutic interventions
Prof. A. Budkowska 15/5/2008

- La ricerca farmacologica, dal laboratorio alla clinica
Dott. D. Valle 22/5/2008

- Sistema degli endocannabinoidi nuovo target terapeutico per l'obesità e le sue complicanze cardio-metaboliche
Prof. U. Fagotto 23/5/2008

- Copy number variations non solo ritardo mentale
Prof. O. Zuffardi 26/5/2008

- Cap Analyses Gene Expression Analyses of transcriptional complexity and regulation
Dr. P. Carninci 5/6/2008

- Mechanical ventilation and multiple organ failure
Dr. Fraus B Plotz 12/6/2008

- Problem solving in epatologia epatica

Prof. G. Faa 13/6/2008

- Tecniche FISH nello studio di linfomi non-Hodgkin

Drssa. MG. Tibiletti 26/6/2008

- From mekacaryocytes to platelets regulation, microenvironment and patholssa. ogy

Drssa. A. Balduini 30/6/2008

- Recenti aspetti in tema di malattie uromodulina associate

Prof. F. Scolari 3/7/2008

- Recombinant protein expression 1/7/2008

- Recombinant antibodies and other affinity reagents 2/7/2008

- Display technologies phage,yeast,bacteria and ribosoma 16/7/2008

- Fluorescent protein 18/7/2008

Prof. A. Bradbury

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI:

th

5 NATIONAL CONFERENCE SIICA

ITALIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY CLINICAL, IMMUNOLOGY AND ALLERGOLOGY

6-9 giugno 2007, Trieste

th

6 NATIONAL CONFERENCE SIICA

ITALIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY CLINICAL, IMMUNOLOGY AND ALLERGOLOGY

11-14 giugno 2008, Roma

COMUNICAZIONI A CONGRESSI:

th

5 NATIONAL CONFERENCE SIICA ITALIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY CLINICAL,
IMMUNOLOGY AND ALLERGOLOGY 6-9 giugno 2007, Trieste

POSTER: Sara Bocca, Cristoforo Comi, Luca Castelli, Elisa Cerutti, Stefania Nicola, Riccardo Mesturini, Umberto Dianzani ;Icos gene haplotypes correlate with IL10 secretion and multiple sclerosis evolution

Involvement of the ICOS gene in development of autoimmune diseases.

th

6 NATIONAL CONFERENCE SIICA ITALIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY CLINICAL,
IMMUNOLOGY AND ALLERGOLOGY 11-14 giugno 2008, Roma

POSTER:Sara Bocca, Luca Castelli, Riccardo Mesturini, Annalisa Chiocchetti, and Umberto

Dianzani; Involvement of the ICOS gene in development of autoimmune diseases

PUBBLICAZIONI

D'Alfonso S, Bolognesi E, Guerini FR, Barizzone N, **Bocca S**, Ferrante D, Castelli L, Ferrante P, Naldi P, Caputo D, Ballerini C, Salvetti M, Galimberti D, Trojano M, Momigliano-Richiardi P. A sequence variation in the MOG gene is involved in Multiple Sclerosis susceptibility. **Genes Immun.** 2008 Jan;9(1):7-15. Epub 2007 Oct 11

Cappellano G, Orilieri E, Comi C, Chiocchetti 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 May 22. [Epub ahead of print]

