

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



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

Relazione 3° anno

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

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

INTRODUZIONE

Aspetti generali dell'autoimmunità.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LA SCLEROSI MULTIPLA (SM).

Epidemiologia

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

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

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

Eziologia

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

Fattori genetici

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

La rilevanza di una suscettibilità genetica viene anche confermata da una incrementata incidenza familiare: circa il 15% dei casi di SM hanno un familiare o un parente affetto; il rischio

di contrarre la malattia è più alto nei fratelli di soggetti con SM e gradualmente diminuisce nei figli e più ancora nei cugini. Si può ritenere che per parenti di primo grado esista un rischio di circa l'1-3% di contrarre la malattia rispetto al rischio di 1/1000-2000 nella popolazione generale. Tale incidenza potrebbe essere in parte dovuta a fattori ambientali più uniformi nell'ambito di uno stesso nucleo ma dati ottenuti in coniugi e figli adottati, suggeriscono che fattori ambientali familiari non incidono sostanzialmente sull'aggregazione familiare della SM.

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

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

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

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

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

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

Fattori virali

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

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

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

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

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

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

Il ruolo di questi patogeni nella genesi della SM rimane sconosciuto. E' possibile che l'agente iniziale possa essere virale, ma anche in tale eventualità si pensa che intervengano successivamente meccanismi autoimmuni responsabili del danno tissutale e della cronicizzazione della malattia. Alcuni virus e batteri possiedono determinanti antigenici identici o simili a normali componenti delle cellule. Questo fenomeno noto come "mimetismo molecolare" potrebbe rappresentare uno dei meccanismi capaci di innescare la risposta autoimmune. Per esempio, l'encefalite allergica sperimentale (EAE) viene indotta immunizzando l'animale con proteine della mielina ed è mediata dai linfociti CD4+ reattivi verso la MBP [26]. La MBP condivide omologie di sequenza con proteine prodotte dai virus del morbillo, dell'influenza e dell'adenovirus. L'infezione da parte di virus esprimenti epitopi simili a componenti *self* sequestrate potrebbe quindi indurre una reazione autoimmune nei confronti di queste ultime.

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

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

Fattori immunologici

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

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

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

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

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

Gli interventi sperimentali di terapia immunologica nell'uomo si sono focalizzati sul blocco dei cloni T CD4+ contro le proteine della mielina, polarizzando le cellule verso un fenotipoTh2 o bloccando la traduzione del segnale via TNF. Queste strategie molto efficienti nel classico modello EAE, non sono altrettanto valide nell'uomo peggiorando a volte il corso della SM. [39-40].

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

L'importanza di una risposta umorale è indicata dalla presenza di immunoglobuline oligoclonali presenti nel liquor in più del 90% dei casi di SM pur non rappresentando una

specificità di questa malattia dal momento che si possono trovare in molte altre patologie infiammatorie del SNC come anche infettive o autoimmuni.

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

Patogenesi

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

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

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

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

Dati recenti dimostrano un importante ruolo dei linfociti CD8+ [45]; esiste infatti una significativa correlazione tra la presenza delle cellule CD8+ ed il danno assonale nelle lesioni sclerotiche [46]. Resta ancora da definire come i linfociti CD8+ contribuiscano alla patogenesi della malattia. Studi su modelli animali hanno suggerito sia un ruolo da “mediatori” che da “soppressori” dell’infiammazione. Nel primo caso, le cellule CD8+ danneggerebbero gli assoni direttamente a seguito del riconoscimento degli epitopi di classe I espressi in superficie dagli assoni stessi o indirettamente, distruggendo le cellule gliali che presentano epitopi di classe I, lasciando gli assoni esposti ad un’altra forma di infiammazione. Nel secondo caso invece, il loro ruolo di “soppressori” si esplicherebbe nel diretto riconoscimento di molecole di classe I sulle cellule CD4+ [47]. Si ipotizza che il contributo dei linfociti CD8+ al danno assonale venga determinato dal rilascio di “mediatori” e una molecola chiave che potrebbe essere coinvolta in questo processo è perforina.

PERFORINA

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

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

Struttura e meccanismo di azione.

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

Nella porzione centrale della molecola è presente una regione che mostra un’elevata omologia con la proteina C9 del complemento e si ipotizza che tale dominio formi una α elica anfipatica che permette l’inserimento di perforina nel doppio strato fosfolipidico. Tale dominio è chiamato MAC (“Membrane Attack Complex”) [48]. Inoltre, vi sono lunghe sequenze all’estremità amino-carbossi terminale, uniche in perforina, le quali appaiono estremamente conservate nel corso

dell'evoluzione. Gli ultimi 200 aminoacidi della sequenza di perforina costituiscono due domini che sono stati precedentemente identificati in altre proteine: il dominio EGF-like (Epidermal Growth Factor) ed infine il dominio di legame alla membrana C2, calcio dipendente [49]. Inoltre, la proteina contiene due siti di N-glicosilazione e viene sintetizzata come precursore inattivo che processato nel carbossiterminale, rilascia circa 20 aminoacidi e si trasforma in proteina attiva [50]. In seguito alla sintesi nel reticolo endoplasmatico rugoso, le molecole di perforina si spostano attraverso i compartimenti del Golgi dove continua la modificazione post-traduzionale e vengono infine impaccate nei granuli litici dei CTL e delle cellule NK.

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

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

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

In realtà, il meccanismo di sinergia tra perforina ed i granzimi non è stato completamente delucidato. Infatti le molecole di granzima possono entrare efficientemente e rapidamente nelle cellule per mezzo dell'endocitosi mediata da recettore [51]. In particolare è stato dimostrato che il recettore del mannosio 6-fosfato (MPR) può agire come recettore per l'internalizzazione di Granzima B, tramite endocitosi mediata da recettore [53].

Infine, le cellule NK e i CTL sono protetti dall'azione di perforina e granzimi in quanto, dopo l'esocitosi dei granuli, la catepsina B, una proteasi lisosomiale, viene espressa sulla superficie cellulare e inattiva le molecole di perforina che si legano alle cellule killer [54]. Utilizzando infatti degli inibitori specifici di catepsina B, si assiste al suicidio perforina-dipendente degli stessi CTL e delle cellule NK dopo la degranolazione. Inoltre, i linfociti citotossici non vanno incontro ad autolisi perché l'attivazione di perforina è calcio-dipendente (sono necessari 100 μ M di ioni calcio per permettere il legame alla membrana) e l'ambiente acido dei granuli stessi "protona" i residui di aspartato del dominio C2, leganti il calcio [55].

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

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

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

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

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

Perforina e le malattie nell'uomo

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

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

Le manifestazioni cliniche e biologiche dipendono da un'incontrollata attivazione di linfociti T, che promuovono la conseguente attivazione di macrofagi e la produzione di citochine. Nei pazienti con HPS in fase attiva, i livelli serici di citochine Th1, tra cui IFN- γ , IL-12 e IL-18 [59-60], sono significativamente più elevati rispetto ai pazienti in remissione o ai controlli sani. IL-18

sembra giocare un ruolo importante nell'induzione della secrezione di IFN- γ e IL-12, i cui livelli correlano positivamente con il progredire della malattia. Anche i livelli di citochine pro-infiammatorie, TNF α , IL-1 β e IL-6, risultano essere elevati nei pazienti con HPS rispetto ai controlli, mentre non c'è alcuna differenza nella secrezione di IL-4 [60-61].

La FHL è una malattia autosomica recessiva che colpisce circa 1/50000 nati. E' una patologia caratterizzata da massiva attivazione macrofagica (definita anche linfoistiocitosi), che insorge di solito dopo un periodo di buona salute e che dura da alcuni mesi ad alcuni anni dopo la nascita [62]. La sindrome è di solito scatenata da un'infezione virale. Nella maggior parte dei casi, i primi segni comprendono febbre elevata senza causa apparente, irritabilità, malessere generale, edema ed epatosplenomegalia. Dal punto di vista biologico possono comparire pancitopenia associata a citolisi epatica, ipertrigliceridemia, fibrinopenia, emodiluizione, alterazioni neurologiche, mentre gli organi viscerali e linfatici sono infiltrati da linfociti e macrofagi attivati che fagocitano i globuli rossi. L'emofagocitosi è infatti un elemento caratteristico di questa malattia. Il midollo osseo è il sito più comune della emofagocitosi, sebbene ne siano affetti frequentemente anche milza, fegato e linfonodi. Quando l'emofagocitosi è prominente nel midollo osseo, si ha una diminuzione di precursori normali a cui si associa pancitopenia.

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

Diversi studi hanno dimostrato che FHL è legata a tre loci genici: 9q21-22 [FHL1] [64]. (Ohadi *et al.*, 1999), 10q21 [FHL2] e 17q25 [FHL3]. Mentre il gene candidato della FHL1 è ancora sconosciuto, mutazioni in perforina sono responsabili della FHL2 [65] e mutazioni in *Munc* 13-4 portano a FHL3 [66].

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

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

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

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

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

Perforina e la Sclerosi Multipla

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

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

SCOPO DEL LAVORO

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

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

Con queste premesse, durante il mio secondo anno di dottorato, ho esteso l'analisi del gene di perforina in un'ampia casistica di pazienti con sclerosi multipla, valutandone il ruolo nello sviluppo della malattia. Il lavoro, qui presentato, completa quello precedente e dimostra che variazioni del gene di perforina possono agire da fattori predisponenti allo sviluppo della sclerosi multipla.



ORIGINAL ARTICLE

Variations of the perforin gene in patients with multiple sclerosis

G Cappellano^{1,11}, E Orilieri^{1,11}, C Comi^{2,3}, A Chiochetti¹, S Bocca¹, E Boggio¹, IS Bernardone¹, A Cometa⁴, R Clementi¹, N Barizzone¹, S D'Alfonso¹, L Corrado¹, D Galimberti⁵, E Scarpini⁵, FR Guerini⁶, D Caputo⁷, D Paolicelli⁸, M Trojano⁸, L Figà-Talamanca⁹, M Salvetti⁹, F Perla¹⁰, M Leone^{1,2}, F Monaco^{1,2} and U Dianzani¹

¹Department of Medical Sciences, Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases, A Avogadro University of Eastern Piedmont, Novara, Italy; ²Department of Neurology, A Avogadro University of Eastern Piedmont, Novara, Italy; ³Neurorehabilitation Center, ML Novarese, Moncrivello, Italy; ⁴Laboratory of Transplant Immunology, Division of Pediatric Hematology/Oncology, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy; ⁵Department of Neurological Sciences, University of Milan, IRCCS Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy; ⁶Laboratory of Molecular Medicine and Biotechnology, Don C Gnocchi Foundation ONLUS, IRCCS, Milan, Italy; ⁷Multiple Sclerosis Unit, Don C Gnocchi Foundation ONLUS, IRCCS, Milan, Italy; ⁸Department of Neurological and Psychiatric Sciences, University of Bari, Bari, Italy; ⁹Neurological Center of Experimental Therapy, University of Rome, La Sapienza, S Andrea Hospital, Rome, Italy and ¹⁰Neurology Division, S Croce e Carle Hospital, Cuneo, Italy

Perforin is involved in cell-mediated cytotoxicity and mutations of its gene (PRF1) cause familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FLH2). PRF1 sequencing in 190 patients with multiple sclerosis and 268 controls detected two FLH2-associated variations (A91V, N252S) in both groups and six novel mutations (C999T, G1065A, G1428A, A1620G, G719A, C1069T) in patients. All together, carriers of these variations were more frequent in patients than in controls (phenotype frequency: 17 vs 9%, $P=0.0166$; odds ratio (OR)=2.06, 95% confidence interval (CI): 1.13–3.77). Although A91V was the most frequent variation and displayed a trend of association with multiple sclerosis (MS) in the first population of patients and controls (frequency of the 91V allele: 0.076 vs 0.043, $P=0.044$), we used it as a marker to confirm PRF1 involvement in MS and assessed its frequency in a second population of 966 patients and 1520 controls. Frequency of the 91V allele was significantly higher in patients than in controls also in the second population (0.075 vs 0.058%, $P=0.019$). In the combined cohorts of 1156 patients and 1788 controls, presence of the 91V allele in single or double dose conferred an OR=1.38 (95% CI=1.10–1.74). These data suggest that A91V and possibly other perforin variations indicate susceptibility to MS. Genes and Immunity (2008) 9, 438–444; doi:10.1038/gene.2008.35; published online 22 May 2008

Keywords: MS; perforin; autoimmune diseases

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system.¹ Its clinical course varies; at onset, approximately 15% of patients display a primary progressive (PP) form, whereas the remainder start out with a relapsing remitting (RR) form and most of them switch to a secondary progressive (SP) form within 10–30 years.² Both environmental and genetic factors are involved in the development/progression of MS and several studies point to a complex inheritance involving interactions

between combinations of loci that may influence the immune response.^{3,4}

Demyelination is obviously a pathological hallmark of MS, but recent evidence has suggested that the clinically relevant cause of functional disability is injury to the axon.⁵ This neurodegenerative model posits that demyelination is a permissive factor that creates an environment in which the axon becomes susceptible to injury mediated either by loss of axo–glial trophic interactions or immune-mediated attack of the denuded axon. The cellular effectors responsible for injuring demyelinated axons are currently unidentified. The fact that CD8⁺ T cells are the most abundant lymphocytes within MS lesions⁶ and correlate with axon injury⁷ suggests that class I-restricted cytotoxic T cells (CTL) may be the culprit.

Cytolytic granules of CD8⁺ CTL and natural killer (NK) cells contain perforin and granzymes, and are released on the target cell upon its recognition by the cytotoxic cell. Perforin polymerizes on the target cell membrane and forms pores allowing entry of granzymes

Correspondence: Professor U Dianzani, Department of Medical Sciences, Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases, A Avogadro University of Eastern Piedmont, Via Solaroli 17, Novara I-28100, Italy.

E-mail: dianzani@med.unipmn.it

¹¹These authors contributed equally to the work.

Received 19 February 2008; revised 3 April 2008; accepted 11 April 2008; published online 22 May 2008

that trigger apoptosis of the target cell by cleaving caspases.⁸

Biallelic loss-of-function mutations of the perforin gene (*PRF1*) have been classically associated with about 30% of cases of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FLH2), a rare life-threatening immune deficiency that occurs in infants and young adults.^{9,10} FLH2 has been classically ascribed to decreased capacity of CTL and NK cells to clear viral infections; viral persistence is thought to cause the lymphoproliferative pattern. FLH2 is a recessive disease and subjects carrying heterozygous *PRF1* mutations are generally healthy. However, some heterozygous variations may favor development of autoimmune diseases. This has been initially suggested for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS), a rare pediatric autoimmune disease due to defective function of the Fas death receptor involved in both downmodulation of the immune response and cell-mediated cytotoxicity.¹¹ ALPS is primarily due to mutations of the Fas gene or other genes involved in Fas function, but other genetic factors may concur. We have detected two FLH2-associated amino-acid substitutions of *PRF1* that are associated with ALPS, that is, N252S and A91V.¹¹ A subsequent work on patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM) detected association with N252S, but not A91V, and a patient displayed a novel mutation causing a P477A amino-acid change decreasing NK function.¹² This work was aimed to evaluate whether *PRF1* also contributes to MS development in the light of recent studies showing that a region of chromosome 10q22.1, located near *PRF1*, may be a susceptibility locus for MS.¹³⁻¹⁵

Results

Analysis of the whole coding region of *PRF1*

The entire coding region of *PRF1* was sequenced in 190 MS and 268 controls to look for variations associated with FLH2 or novel variations (Figure 1). Four missense

variations were detected, that is, C272T (rs35947132), A755G (rs28933375), G719A and C1069T (nomenclatures are referred to the CcnBank cDNA clone M28393, Δ ATG = +1) causing A91V, N252S, R240H and R357W amino-acid substitutions, respectively. A91V and N252S are variations previously associated with FLH2, whereas R240H and R357W are new.

Four other novel variations, C999T, G1065A, G1428A and A1620G, were detected, but they were synonymous variations (P333P, P355P, G476G and Q540Q, respectively); analysis of their putative effect on splice sites using the Spliceview software and ESEfinder scoring matrix showed that only A1620G (Q540Q) may have an effect by creating a novel acceptor splice site (Spliceview) and a novel binding site for Ser/Arg-rich proteins (ESEfinder), a family of conserved splicing factors.

Finally, we detected the two nucleotide variations, C822T (rs885821) and T900C (rs885822), previously reported as common polymorphisms not associated with FLH2; they did not change the amino acid, nor influence the splicing sites. Their frequency was similar in the patients and the controls. Two other synonymous variations (G435A and A462G) are known to be in perfect linkage disequilibrium with N252S and were in fact only detected in the two subjects (one patient and one control) carrying this variation.¹¹

A91V was detected 29 times in 26 patients (23 heterozygotes, 3 homozygotes) and 23 controls (heterozygotes); N252S in 1 patient and 1 control (heterozygotes); R240H in 2 patients (heterozygotes); R357W, P333P, P355P, and G476G in 1 patient each (heterozygotes); and Q540Q in 1 patient (homozygote). The R357W and P355P carriers were also heterozygous for A91V, and the two variations were found to be on different alleles by allele-specific PCR. All together, frequency of the FLH2-associated and novel variations was higher in patients than in controls (allele frequencies: 0.100 vs 0.045, $P = 0.0016$; phenotype frequency: 17 vs 9%, $P = 0.0166$; odds ratio (OR) = 2.06, 95% confidence interval (CI): 1.13-3.77; Table 1).

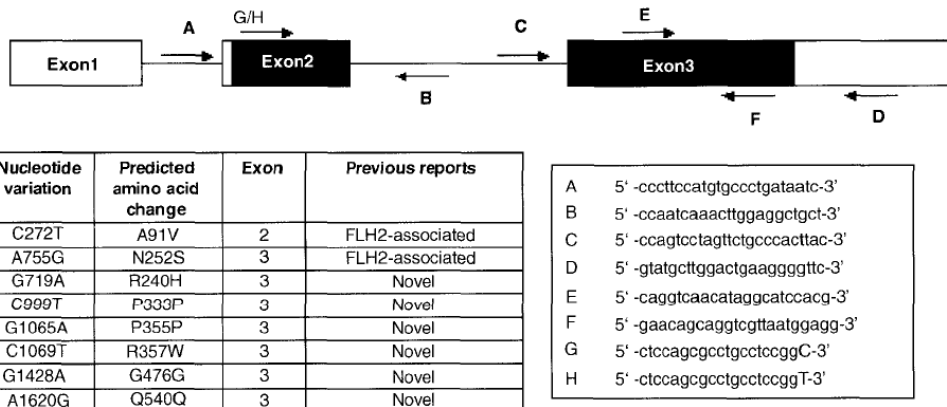


Figure 1 Graphical representation (not in scale) of the *PRF1* gene, primers used for typing and the variations found in MS patients. The upper panel shows a scheme of the gene and the relative position of the primers; boxes represent the exons (the coding region is shown in black), lines the introns. Letters and arrows indicate the primers used to amplify and sequence the gene (see Materials and methods) and their sequence is shown in the lower right table. The lower left panel shows a summary of the FLH2-associated (*) and novel *PRF1* variations detected in 190 MS patients and 268 controls.

Table 1 Summary of the genotypes of 190 MS patients and 268 controls carrying *PRF1* variations

Allele 1	Allele 2	MS (n = 190) ^a	Controls (n = 268) ^a
A91V	A91V	3	0
A91V	R357W	1	0
A91V	P355P	1	0
Q540Q	Q540Q	1	0
A91V	wt	21	23
N252S	wt	1	1
R240H	wt	2	0
P333P	wt	1	0
G476G	wt	1	0
Total		32 (17%)	24 (9%)

^bOR = 2.06, 95% CI: 1.13–3.77; P = 0.0166

Abbreviations: CI, confidence intervals; MS, multiple sclerosis; OR, odds ratio; wt, wild type.

^aNumber of subjects (frequency in the brackets).

^bOR and 95% CI limits; P-values are two-tailed.

The PolyPhen algorithm was used to predict the functional effect of the two novel R240H and R357W missense variations and showed that both may damage the function and structure of the protein (R240H: score = 2.335; R357W: score = 2.690). Therefore, we directly assessed whether R240H affects perforin function by evaluating NK activity in the 2 patients carrying the variation and 15 controls. Results showed that, at low effector/target ratios, NK activity was defective in one patient and in the low level (that is, within the first quartile) of the normal range in the other (Figure 2). This analysis was not performed in the R357W carrier because his cells were not available. Intriguingly, both patients carrying R240H displayed an early switch from the RR to the SP course (5 and 6 years from onset, respectively) and a multiple sclerosis severity score (MSSS) of 7.65 and 7.38, respectively. By contrast, this aggressive clinical evolution was not displayed by the R357W carrier.

Search for the A91V variation in a second population of patients and controls

Although A91V was the most frequent variation and displayed a trend of association with MS in the first population of patients and controls (frequency of the 91V allele: 0.076 vs 0.043, P = 0.044), we used it as a marker to confirm *PRF1* involvement in MS, and assessed its frequency in a second independent population of 966 patients and 1520 ethnically and geographically matched controls. The 91V allele was carried by 138 patients (131 heterozygotes and 7 homozygotes) and 168 controls (160 heterozygotes and 8 homozygotes) and its frequency was significantly higher in patients than in controls (0.075 vs 0.058%, P = 0.019). In the combined cohorts of 1156 patients and 1788 controls, presence of the 91V allele in single or double dose conferred an OR = 1.38 (95% CI = 1.10–1.74; Table 2).

No differences were found between subjects carrying or not carrying A91V in terms of gender distribution, MS clinical form (RR, PP and SP) and MSSS (data not shown). Moreover, frequency of the MS susceptibility allele HLA-DR15 was not different in patients carrying A91V or not, as HLA-DR15 was carried by 32% of

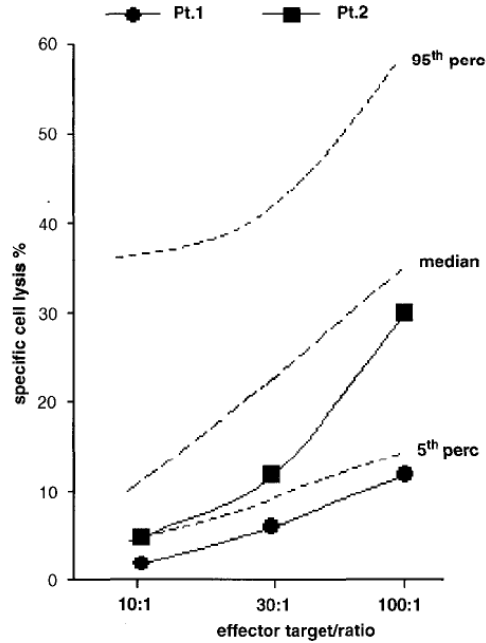


Figure 2 NK activity in PBMC of MS patients carrying the R240H perforin variations and controls. NK activity was assessed at the 100:1, 30:1, and 10:1 effector/target (E:T) ratios; continuous lines indicate patients; stripped and dotted lines indicate the median values and interquartile ranges of 15 controls.

Table 2 Genotype frequencies of A91V in the combined cohorts of MS patients (n = 1156) and healthy controls (n = 1788)

Genotypes	MS (n = 1156) ^a	Controls (n = 1788) ^a
AA	992 (0.858)	1597 (0.893)
AV	154 (0.133)	183 (0.102)
VV	10 (0.009)	8 (0.005)
AV+VV vs AA	^b OR = 1.38, 95% CI = 1.10–1.74; P = 0.005	

Abbreviations: CI, confidence intervals; MS, multiple sclerosis; OR, odds ratio.

^aNumber of subjects; frequencies are shown in the brackets. Genotypic distribution did not deviate significantly from the Hardy-Weinberg equilibrium in any group (data not shown).

^bOR and 95% CI limits; P-values are two-tailed.

patients with the 91V allele, 29% of patients without it and 12% of the controls.

Discussion

Multiple sclerosis is a complex disease that is probably the result of multiple genetic and environmental factors. Several genes have been involved in its development,⁴ and some of them are important in the immune response. This work shows that *PRF1* may also be involved, as MS patients displayed higher frequency of *PRF1* variations

than the controls. This confirms data obtained by other authors showing that the chromosome region 10q22.1, where *PRF1* is located, contains susceptibility genes for MS development.^{13–15}

The most frequent variation was A91V, as frequency of the 91V allele was increased in two independent populations of MS patients than in the respective controls, and increased the risk of MS by about 1.4-fold in the combined cohorts. By contrast, A91V did not seem to influence the disease course as MSSS was not different between patients with or without A91V. Studies based on analysis of cytotoxic lymphocytes from A91V carriers or rat basophil leukemia cells transfected with variants of the perforin cDNA have shown that A91V decreases perforin function by altering its conformation, decreasing its cleavage to the active form and increasing its degradation.^{16,17} Risma *et al.*¹⁸ classified A91V as a class 1 missense mutation with limited functional impact that allows partial maturation of the protein. Voskoboinik *et al.*¹⁹ have recently used a complementation assay with perforin-knockout primary CTL to show that A91V reduces both the steady-state level of perforin expression in effector cells ('presynaptic' dysfunction) and its intrinsic lytic capacity on target cells, and also displays some dominant-negative effect on the wild-type protein ('postsynaptic' dysfunction).

Our previous work showed that frequency of the 91V allele was also increased in an incomplete variant of ALPS, whereas N252S was associated with the typical form of ALPS and T1DM.^{11,12} The functional significance of N252S is debated, but we showed that it may be associated with decreased NK activity in the early childhood.^{11,12} Although frequency of N252S was apparently not different in MS and controls, it is possible that *PRF1* variations favor development of several autoimmune diseases, with differences reflecting their effects on perforin function. A91V has also been associated with other immune diseases, such as lymphomas and acute childhood lymphocytic leukemia, and atypical (late-onset) FLH2.^{20,21}

Besides A91V and N252S, we detected two new missense *PRF1* mutations in MS patients that cause R240H and R357W amino-acid substitutions. R240H occurs nearby N252S within the membrane-attack complex, a region critically involved in the pore-forming activity of perforin.²² However, analysis of NK activity in the two R240H carriers showed that it was near the low limit of the normal range. Although both carriers were heterozygous, we suggest that R240H causes a mild decrease of perforin function without exerting a dominant-negative effect on the wild-type form. R357W is located in the same domain, but we could not evaluate its functional effect because fresh cells from the carrier were not available. However, both R357W and R240H were predicted to damage perforin function and structure by *in silico* analysis with the PoliPhen program.

Four other novel mutations were detected in MS patients, but they were synonymous (P333P, P355P, G476G, Q540Q). Q540Q may have an effect on RNA splicing, as it seems to create a new acceptor splice site. The others did not influence canonical splicing sites, but they might theoretically influence perforin expression by disturbing exonic splicing enhancers, mRNA processing and transport, efficiency of codon usage by tRNA

stability of mRNA secondary structure, protein folding or interaction with microRNA.^{23–28} An alternative possibility is that they do not have a direct effect, but they are linkage disequilibrium with other unknown *PRF1* mutations in the 5' UTR. However, we could not assess perforin expression because fresh cells from the carriers were not available.

Besides A91V, the other mutations are too rare to draw conclusions about their individual association with MS, but they raise the possibility that the overall effect of *PRF1* variations on MS development may be substantially higher than that detected by A91V alone. In line with this possibility, these variations conferred a global OR = 2.06 for MS development in the first population of patients and controls whose entire *PRF1*-coding region was sequenced. It is intriguing that two patients were compound heterozygous for A91V, and R357W or P355P, respectively, and another patient was homozygous for Q540Q, which raises the possibility that the biallelic variations may have contributed to their MS. The MS association with several rare *PRF1* variations is in line with reports on systemic lupus erythematosus and inflammatory bowel disease indicating that private/rare variations as well as common polymorphisms of other genes may be important in common complex diseases.^{29,30}

Perforin-mediated cytotoxicity has been classically associated with clearance of virus-infected cells. Therefore, it is possible that defects of perforin activity favor MS development by delaying virus clearance, which may favor development of crossreactions between viral and self-antigens by molecular mimicry. In this context, it is noteworthy that EBV infections are crucial in FLH2 pathogenesis, and have also been suggested to be important as triggering factors in MS.^{31,32}

On the other hand, an increasing bulk of data suggests that perforin and cell-mediated cytotoxicity may also be involved in downmodulation of the immune response. This regulatory activity may involve several mechanisms including perforin-mediated killing of effector lymphocytes and antigen-presenting cells. Defective immune response switching off may favor both lymphocyte accumulation and autoimmunity.^{8,33–36} It is noteworthy that involvement of inherited defects of the immune response switching off in MS development may not be limited to *PRF1*, but may also involve defective apoptosis of activated lymphocytes induced through the Fas or the activation-induced cell death (AICD) mechanisms. This possibility is suggested by our previous work showing that substantial proportions of MS patients carry inherited defects of Fas function similar to those displayed by ALPS patients.³⁷ Moreover, several reports detected high serum levels of osteopontin, a cytokine capable to inhibit AICD, in MS patients and we found that this is partly associated with variants of the osteopontin gene.^{38–41}

In conclusion, this work suggests that *PRF1* variations may be a predisposing factor for MS by affecting either the antiviral response or the immune response switching off. Defects of both of these functions may favor development of autoimmunity by prolonging the immune response and increasing the risk of crossreactions between viral and self-antigens. Similar defects may be caused also by alterations of other genes and may be a general predisposing factor for autoimmunity.

Materials and methods

Patients

We analyzed two independent cohorts of Italian patients (391 men, 765 women; M/F: 1/1.96) with MS, diagnosed according to McDonald *et al.*'s criteria⁴² and randomly selected ethnically matched healthy controls. The first population was composed of 190 patients and 268 controls, the second by 966 patients and 1520 controls.

Patients were consecutive patients enrolled from the Multiple Sclerosis Centers of the 'Amedeo Avogadro' University of Eastern Piedmont (Novara), the University of Milan, IRCCS Maggiore Policlinico Hospital (Milan), the Don Gnocchi Institute (Milan), the Santa Croce Hospital (Cuneo), the University of Rome 'La Sapienza', S Andrea Hospital (Rome) and the University of Bari (Bari). Their clinical and demographic features were similar to those of other series.^{43,44} Controls were consecutive Italian donors obtained from the transfusion services of the respective hospitals. Patients and controls were unrelated, Caucasian and Italian, matched for age and gender, and analyzed as follows:⁴⁵

1. RR: Occurrence of exacerbations, each lasting at least 24 h and separated by at least 1 month of inactivity, with full recovery or sequelae ($n = 852$).
2. PP: Steady worsening of symptoms and signs from onset for at least 6 months, whether superimposed with relapses or not, with occasional plateau and temporary minor improvements ($n = 92$).
3. SP: Initial RR course followed by steady worsening of symptoms and signs for at least 6 months, whether superimposed with relapses or not, with minor remissions and plateaux ($n = 212$).

Progression of disability was assessed with the MSSS.⁴⁶ In RR patients, MSSS score was assessed in remission phase.

All patients gave their informed consent according to the Declaration of Helsinki.⁴⁷ The research was approved by the Novara ethical committee.

Amplification of PRF1 and mutation detection

Genomic DNA was isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using standard methods and exons 2 and 3 of the PRF1-coding region were amplified in standard PCR conditions. PCR products were purified with the EXO/SAP kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). In the first population, the entire coding region was sequenced with the ABI PRISM BigDye Terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on an automatic sequencer (Applied Biosystems 3100 Genetic Analyser) according to the manufacturer's instructions. Figure 1 shows primers used for amplification, sequencing and typing. Briefly, exon 2 was amplified with primers A + B (755 bp) and sequenced with the same oligonucleotides. Exon 3 was amplified with C + D (1289 bp) and sequenced with these and with two additional internal primers (E and F). In the second population, the +272 C/T (A91V) variation was typed by sequencing (233 patients and 548 controls) or by the TaqMan 5'-allelic discrimination assay (733 patients and 972 controls; Applied Biosystems). Allelic-specific primers and probes used for discrimination have been previously described.²⁰ Genotyping of each sample was automatically attributed by the SDS 1.3 software for

allelic discrimination. Similar results were obtained in patients typed by the two methods. All variations were confirmed twice by sequencing independent DNA samples. The genotypic distribution of the variation did not deviate significantly from the Hardy-Weinberg equilibrium in any group.

Allele-specific PCR

The wild-type (91A) and mutant (91V) alleles were separately amplified using specific PCR amplification of genomic DNA (forward primer: G or H; reverse primer: D). PCR products were typed for P355P and R357W by sequencing with the ABI PRISM BigDye Terminator kit on the 3100 Genetic Analyser using the internal primer E.

HLADRB1 typing

Patients and controls were specifically typed for DRB1*1501 allele as previously described.⁴⁸

Cytotoxicity assays

Natural killer activity of PBMC was assessed by a standard 4 h ⁵¹Cr-release assay with K562 cells as the target. Results are expressed as specific lysis % calculated as follows: (sample ⁵¹Cr release - spontaneous release) / (maximal release - spontaneous release) × 100.

Statistical analysis

Phenotype frequencies were calculated as the number of individuals carrying an allele (either homozygotes or heterozygotes) divided by the total number of individuals.

Allelic and phenotype frequencies were compared with the χ^2 -test with the Yates correction. All *P*-values are two-tailed and the significance cutoff was $P < 0.05$. Putative effect of the variation on splicing sites was evaluated using the SpliceView program on the WebGene website (<http://www.itb.cnr.it/sun/webgene/>) and the ESEfinder scoring matrix (<http://www.rulai.cshl.edu/tools/ESE>). Putative functional significance of the missense variations was evaluated with the PolyPhen program (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>).

Acknowledgements

This work was partially supported by FISM grant 2005/R/10 (Genoa), Telethon grant E1170 (Rome), AIRC (Milan), PRIN Project (MIUR, Rome), Compagnia di San Paolo (Turin), Fondazione Cassa di Risparmio di Cuneo (Cuneo), Regione Piemonte (Ricerca Sanitaria Finalizzata Project and Ricerca Sanitaria Applicata-CIPE Project), Associazione 'Amici di Jean' (Turin), Fondazione Lagrange (Turin) and Centro Dino Ferrari (Milan).

Disclosure

The authors report no conflict of interest.

References

- 1 Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2002; **359**: 1221-1231.
- 2 Weinshenker BG. The natural history of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 1995; **13**: 119-146.

- 3 Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**: 683–747.
- 4 Steinman L, Martin R, Bernard C, Conlon P, Oksenberg JR. Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy. *Annu Rev Neurosci* 2002; **25**: 491–505.
- 5 Howe CL, Rodriguez M. Remyelination as neuroprotection. In: Waxman SG (ed). *Multiple Sclerosis as a Neuronal Disease*. Elsevier Academic Press: San Diego, 2005, pp 389–419.
- 6 Babbe H, Roers A, Waisman A, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000; **192**: 393–404.
- 7 Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kulmann T, Brück W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 2000; **123**: 1174–1183.
- 8 Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**: 735–747.
- 9 Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, Bhawan S, Certain S, Mathew PA et al. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* 1999; **286**: 957–959.
- 10 Clementi R, zur Stadt U, Savoldi G, Varoito S, Conter V, De Fusco C et al. Six novel mutations in the *PRF1* gene in children with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet* 2001; **38**: 643–646.
- 11 Clementi R, Chiocchetti A, Cappellano G, Cerutti E, Ferretti M, Orilieri E et al. Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function. *Blood* 2006; **108**: 3079–3084.
- 12 Orilieri E, Cappellano G, Clementi R, Cometa A, Ferretti M, Cerutti E et al. Variations of the perforin gene in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2008; **57**: 1078–1083.
- 13 Goertsches R, Villoslada P, Comabella M, Montalban X, Navarro A, de la Concha EG. A genomic screen of Spanish multiple sclerosis patients reveals multiple loci associated with the disease. *J Neuroimmunol* 2003; **143**: 124–128.
- 14 Goertsches R, Comabella M, Navarro A, Perkal H, Montalban X. Genetic association between polymorphisms in the ADAMTS14 gene and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2005; **164**: 140–147.
- 15 Goertsches R, Baranzini SE, Morcillo C, Nos C, Camiña M, Oksenberg JR et al. Evidence for association of chromosome 10 open reading frame (C10orf27) gene polymorphisms and multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008; **14**: 412–414.
- 16 Trambas C, Gallo F, Pende D, Marcenaro S, Moretta L, De Fusco C et al. A single amino acid change, A91V, leads to conformational changes that can impair processing to the active form of perforin. *Blood* 2005; **106**: 932–937.
- 17 Voskoboinik I, Thia MC, Trapani JA. A functional analysis of the putative polymorphisms A91V and N252S and 22 missense perforin mutations associated with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 2005; **105**: 4700–4706.
- 18 Risma KA, Frayer RW, Filipovich AH, Sumegi J. Aberrant maturation of mutant perforin underlies the clinical diversity of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Clin Invest* 2006; **116**: 182–192.
- 19 Voskoboinik I, Sutton VR, Ciccone A, House CM, Chia J, Darcy PK et al. Perforin activity and immune homeostasis: the common A91V polymorphism in perforin results in both pre- and post-synaptic defects in function. *Blood* 2007; **110**: 1184–1190.
- 20 Mehta PA, Davies SM, Kumar A, Devidas M, Lee S, Zamzow T et al. Perforin polymorphism A91V and susceptibility to B-precursor childhood acute lymphoblastic leukaemia: a report from the Children's Oncology group. *Leukemia* 2006; **20**: 1539–1541.
- 21 Clementi R, Locatelli F, Dupré L, Garaventa A, Emmi L, Bregni M et al. A proportion of patients with lymphoma may harbor mutations of the perforin gene. *Blood* 2005; **105**: 4424–4428.
- 22 Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**: 940–952.
- 23 Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002; **3**: 285–298.
- 24 Lavner Y, Kotlar codon bias as a factor in regulating expression via translation rate in the human genome. *Gene* 2005; **345**: 127–138.
- 25 Kotlar D, Lavner Y. The action of selection on codon bias in the human genome is related to frequency, complexity, and chronology of amino acids. *BMC Genomics* 2006; **7**: 67.
- 26 Shabalina SA, Ogurtsov AY, Spiridonov NA. A periodic pattern of mRNA secondary structure created by the genetic code. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**: 2428–2437.
- 27 Komar AA. Genetics. SNPs, silent but not invisible. *Science* 2007; **315**: 466–467.
- 28 Martin MM, Buckenberger JA, Jiang J, Malana GE, Nuovo GJ, Chotani M et al. The human angiotensin II type 1 receptor +1166 A/C polymorphism attenuates microRNA-155 binding. *J Biol Chem* 2007; **282**: 24262–24269.
- 29 Lee-Kirsch MA, Gong M, Chowdhury D, Senenko L, Engel K, Lee YA et al. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2007; **39**: 1065–1067.
- 30 Lesage S, Zouali H, Cézard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002; **70**: 845–857.
- 31 Lunemann JD, Munz C. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Curr Neurol* 2007; **7**: 253–258.
- 32 Chuang HC, Lay JD, Hsieh WC, Su JJ. Pathogenesis and mechanism of disease progression from hemophagocytic lymphohistiocytosis to Epstein-Barr virus-associated T-cell lymphoma: nuclear factor-kappaB pathway as a potential therapeutic target. *Cancer Sci* 2007; **98**: 1281–1287.
- 33 Su MW, Pyarajan S, Chang JH, Yu CL, Jin YJ, Stierhof YD et al. Fratricide of CD8+ cytotoxic T lymphocytes is dependent on cellular activation and perforin-mediated killing. *Eur J Immunol* 2004; **34**: 2459–2470.
- 34 Badovinac VP, Hamilton SE, Harty JT. Viral infection results in massive CD8+ T cell expansion and mortality in vaccinated perforin-deficient mice. *Immunity* 2003; **18**: 463–474.
- 35 Zhou S, Ou R, Huang L, Moskophidis D. Critical role for perforin-, Fas/FasL-, and TNFR1-mediated cytotoxic pathways in down-regulation of antigen-specific T cells during persistent viral infection. *J Virol* 2002; **76**: 829–840.
- 36 de Saint Basile G, Fischer A. Defective cytotoxic granule-mediated cell death pathway impairs T lymphocyte homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 2003; **15**: 436–445.
- 37 Comi C, Leone M, Bonisssini S, DeFranco S, Bottarel F, Mezzatesta C et al. Defective T cell Fas function in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2000; **55**: 921–927.
- 38 Chiocchetti A, Comi C, Indelicato M, Castelli L, Mesturini R, Bensi T et al. Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *J Neuroimmunol* 2005; **63**: 172–178.
- 39 Hur EM, Youssef S, Haws ME, Zhang SY, Sobel RA, Steinman L. Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nat Immunol* 2007; **8**: 74–83.
- 40 Comabella M, Pericot I, Goertsches R, Nos C, Castello M, Blas Navarro J et al. Plasma osteopontin levels in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2005; **158**: 231–239.
- 41 Vogt MH, Lopatinskaya L, Smits M, Polman CH, Nagelkerken L. Elevated osteopontin levels in active relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2003; **53**: 819–822.
- 42 McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; **50**: 121–127.

- 43 Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J *et al*. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 1989; **112**: 133–146.
- 44 Trojano M, Avorio C, Mannari C, Calò A, De Robertis F, Serio G *et al*. Multivariate analysis of predictive factors of multiple sclerosis course with a validated method to assess clinical events. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995; **58**: 300–306.
- 45 Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology* 1996; **48**: 907–911.
- 46 Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S *et al*. Multiple sclerosis severity score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 2005; **64**: 1144–1151.
- 47 International Committee of Medical Journal Editors. Protection of patients' rights to privacy. *BMJ* 1995; **311**: 1272.
- 48 D'Alfonso S, Bolognesi E, Guerini FR, Barizzone N, Bocca S, Ferrante D *et al*. A sequence variation in the MOG gene is involved in multiple sclerosis susceptibility in Italy. *Genes Immun* 2008; **9**: 7–15.

BIBLIOGRAFIA

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

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

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

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

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

- 52.** Smyth M.J., Thia K.Y., Street S.E., MacGregor D., Godfrey D.I., Trapani J.A. Perforin mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 2000;192:755-760.
- 53.** Motyka B., Korbitt G., Pinkoski M.J., Heiben J.A., Caputo A., Hobman M., Barry M., Shostak I., Sawchuk T., Holmes C.F. Mannose 6-phosphate/insuline like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 2000;103: 491-500.
- 54.** Balaji, K.N., Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M. & Henkart, P.A. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med* 2002; 196:493-503.
- 55.** Voskoboinik I, Thia MC, Fletcher J, Ciccone A, Browne K, Smith MJ, Trapani Ja. Calcium dependent plasma membrane and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: a critical role for aspartate residues 429, 435, 483 and 485, but not 491. *J Biol Chem* 2005;280:8426-8434.
- 56.** Kagi, D., Ledermann, B., Burkl, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K.J., Podack, E.R., Zinkernagel, R.M. & Hengartner, H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994; 369:31-37.
- 57.** Jordan, M.B., Hildeman, D., Kappler, J. and Marrack, P.: An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) CD8+ T cells and interferon gamma are essential for the disorder. *Blood* 2004;104:735-743.
- 58.** Moretta, L., Moretta, A., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. On the pathogenesis of perforin defects and related immunodeficiencies. *Immunology Today* 2000; 21:593-594.
- 59.** Osugi, Y., Hara, J and Tagawa, S. Cytokine production regulating Th1 and Th2 cytokines in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 1997; 89:4100-4103.
- 60.** Takada H., Nomura A., Ohga S., Hara T. Interleukin-18 in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Leuk Lymphoma* 2001; 42:21-28.

- 61.** Ishii E., Ohga S., Aoki T., et al. Prognosis of children with virus-associated hemophagocytic syndrome and malignant histiocytosis: correlation with levels of serum interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Acta Haematol* 1991; 85:93-99.
- 62.** Clementi, R., Emmi, L., Maccario, R., Liotta, F., Moretta, L., Danesino, C. & Arico, M. Adult onset and atypical presentation of hemophagocytic lymphohistiocytosis in siblings carrying PRF1 mutations. *Blood* 2002; 100:2266-2267.
- 63.** Fadeel, B., Orrenius, S. & Henter, J.I. Induction of apoptosis and caspase activation in cells obtained from familial haemophagocytic lymphohistiocytosis patients. *Br J Haematol* 1999;106:406-415.
- 64.** Ohadi, M., Lalloz, M.R., Sham, P., Zhao, J., Dearlove, A.M., Shiach, C., Kinsey, S., Rhodes, M. & Layton, D.M. Localization of a gene for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis at chromosome 9q21.3-22 by homozygosity mapping. *Am. J Hum Genet* 1999; 64:165-171.
- 65.** Stepp S.E., Dufourcq-Lagelouse R., Le Deist F., Bhawan S., Certain S., Mathew P.A., Henter J.I., Bennett M., Fischer A., De Saint Basile G. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* 1999;286: 1957-1959.
- 66.** Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., Lambert, N., Ouachee-Chardin, M., Chedeville, G., Tamary, H., Minard-Colin, V., Vilmer, E., Blanche, S., Le Deist, F., Fischer, A. & de Saint Basile, G. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 2003; 115:461-473.
- 67.** Kogawa, K., Lee, S.M., Villanueva, J., Marmer, D., Sumegi, J. & Filipovich, A.H. Perforin expression in cytotoxic lymphocytes from patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis and their family members. *Blood* 2002; 99:61-66.
- 68.** Busiello, R., Adriani, M., Locatelli, F., Galgani, M., Fimiani, G., Clementi, R., Ursini, M.V., Racioppi, L. & Pignata, C. Atypical features of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 2004; 103: 4610-4612.

- 69.** Molleran Lee, S., Villanueva, J., Sumegi, J., Zhang, K., Kogawa, K., Davis, J. & Filipovich, A.H. Characterisation of diverse PRF1 mutations leading to decreased killer cell activity in North American families with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J. Med. Genet* 2004;41: 137-144.
- 70.** Voskoboinik, I., Thia, M-C., De Bono, A., Browne, K., Cretney, E., Jackson, J.T., Darcy, P.K., Jane, S.M., Smyth, M.J. & Trapani, J.A. The functional basis for hemophagocytic lymphohistiocytosis in a patient with co-inherited missense mutations in the perforin (PFN1) gene. *J Exp Med* 2004; 200: 811-816.
- 71.** Suga, N., Takada, H., Nomura, A., Ohga, S., Ishii, E., Ihara, K., Ohshima, K. & Hara, T. Perforin defects of primary haemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Br J Hematol* 2002;116:346-349.
- 72.** Clementi R, Chiochetti A, Cappellano G, et al. Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function. *Blood* 2006;108:3079-84.
- 73.** Solomu E, Gibellini F, Stewart B. Perforin gene mutations in patients with acquired aplastic anemia. *Blood* 2007; 109:5234-7.
- 74.** Cannella S, Santoro A, Bruno G. Germline mutations of the perforin gene are afrequent occurrence in childhood anaplastic large lymphoma. *Amer Cancer Soc* 2007; 2566-2570.
- 75.** Gasque P, Jones J, Singhrao SK, Morgan P. Identification of an Astrocyte Cell Population from Human Brain that Expresses Perforin; a Cytotoxic Protein Implicated in Immune Defence. *J Exp Med* 1998; 187: 451 – 460.
- 76.** Zeine R, Cammer W, Barbarese E, Liu CC, Raine CS. Structural dynamics of oligodendrocyte lysis by perforin in culture : relevance to multiple sclerosis. *The Journal of Neuroscience* 2001; 64 : 380 – 391.
- 77.** Howe C.L and Rodriguez, M. Remyelination as neuroprotection. In: *Multiple Sclerosis as a Neuronal Disease*. S.G. Waxman, Ed. Elsevier Academic Press, San Diego 2005: 389–419.

CORSI FREQUENTATI I anno:

Corso di Inglese. Docente: Prof. Irving Bell.

CORSI FREQUENTATI II anno:

Corso di Statistica. Docente: Prof. Magnani.

SEMINARI INTERNI AL DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

Anno Accademico 2005/06

18 Novembre 2005

Dr.Diego Cotella

“Cardiac Potassium channel regulation by accessori subunits”

23 Novembre 2005

Prof. Luigi Elio Adinolfi

“HCV-related steatosis:pathogenic mechanism and clinical implications”

25 novembre 2005

Prof. Robert Tjian

“Mechanism of transcriptional regulation and disease”

19 Gennaio 2006

Prof.Maria Grano

“Mechanism of osteolytic lesions in multiple mieloma: uncouplin between bone resorption and formation”

13 Febbraio 2006

Prof. Ferdinando Nicoletti

“New perspectives in metabotropic glutamate receptors”

15 Febbraio 2006

Prof. DANiele Sblattero

“Anticorpi ricombinanti: un potente tool biotecnologico”

13 Marzo 2006

Dr.Antonia Follenzi

“Il trapianto di cellule endoteliali (les) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell'emofilia”

20 Marzo 2006

Dr Mikael Knip

“The Natural course of preclinical type I Diabetes

6 Aprile 2006

Dott. Francesco Forconi

Aspetti immunogenetici e terapeutici della “hairy cell leukemia”

20 Aprile 2006
Dott.ssa Daniela Cilloni
“Terapie molecolari nelle malattie mieloproliferative”

4 maggio 2006
Dott. Luciano Mutti
“I mesotelioma: un modello di terapia traslazionale”

18 Maggio 2006
Prof. Marco Lenzi
“L’epatite autoimmune”

30 Maggio 2006
Prof. MariaLuisa Lavitrano
“Sperm mediated Gene Transfer: storia e applicazioni”

15 Giugno 2006
Prof. Guido Tarone
Melusin: a stretch sensor molecule controllino adaptive cardiac remodeling to pressure overload.

27 Giugno 2006
Prof. Lia Remondini
“Osteointegrazione e superfici implantari”

5 luglio 2006.
Dott.ssa Renata Grifantini
DNA and protein arrays in infection diseases: from basic research to vaccine design.

11 settembre 2006
Dr Prof. Dieter Brömme
“The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis”

Anno Accademico 2006/07

GENE SILENCING BY RNA INTERFERENCE (RNAI)

10 GENNAIO 2007

Prof.ssa P. DeFilippi

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

17 GENNAIO 2007

Prof. M. Caselle

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

18 GENNAIO 2007

Prof. G.F. Bottazzo

GENE THERAPY STRATEGIES FOR PHENYLKETONURIA

1 FEBBRAIO 2007

Prof. B. Thöny

FRAGILE X SYNDROME FROM RNA METABOLISM IMPAIRMENT TO SPINE
DYSMORPHOGENESIS

22 FEBBRAIO 2007

Prof. C. Bagni

VITA, OPERE E MIRACOLI DELL'EPATOCITA

9 FEBBRAIO 2007

Prof. M Tripodi

PROTEIN MICROARRAYS DEVELOPMENT OF NEW SUPPORTS FOR IMPROVED
SENSITIVITY

14 MARZO 2007

Dr. M. Cretich

COLANGIOPATIE AUTOIMMUNI

15 MARZO 2007

Prof. M. Podda

MICROARRAYS DI TESSUTI: UNA STRATEGIA PER IDENTIFICARE NUOVI
BIOMARCATORI TUMORALI

16 MARZO 2007

Dott.ssa M. Capra

DROSOPHILA AS A MODEL FOR AGING AND CANCER

16 MARZO 2007

Dott. Bohmann

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

29 MARZO 2007

Prof. E. Mini

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

12 APRILE 2007

Prof. Milanesio

DIFETTI GENETICI DEL PRE-B CELL RECEPTOR

16 MAGGIO 2007

Prof. Ferrari

THE REGULATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS BY SMAD SIGNALING

25 MAGGIO 2007

Dott. Karlsson

TRANSLATING BASIC SCIENCE INTO THERAPEUTIC STRATEGIES FOR
SHWACHMANN DIAMOND SYNDROME

28 MAGGIO 2007

Dott. Ellis

SINDROMI AUTINFIAMMATORIE

4 GIUGNO 2007

Prof. A Martini

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

21 GIUGNO 2007

Prof. E Mignone

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 traffickng 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. Palumbo

21/2/2008

Caratterizzazione molecolare della leukemia linfatica cronica

Prof. V. Gattei

28/2/2008

Analytic vaccinalogy and human citomegalovirus 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 misfoding
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. Baussano
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' obesita' e le sue complicanze
cardio-metaboliche
Prof. U. Pagotto
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

CONGRESSI FREQUENTATI:

1. 16th EUROPEAN CONGRESS OF IMMUNOLOGY, **PARIS**, 6-9 SEPTEMBER 2006 (**I ANNO**).
2. XIV TELETHON CONVENTION, PALAZZO DEI CONGRESSI, **SALSOMAGGIORE TERME** 12-14 MARZO 2007 (**II ANNO**).
3. EUROPEAN BIOLPINE CONVENTION. Inflammation and autoimmunity:bridging public and private research. **COLLERETTO GIACOSA (TO)**, 6-7 NOVEMBRE 2007. (**III ANNO**).
4. "MicroRNA in Biology and Disease", **PADOVA**, 4 dicembre 2008) (**III ANNO**).
5. VI SIICA NATIONAL CONFERENCE, Università La Sapienza, **ROMA**, 11-14 giugno 2008) (**III ANNO**).

COMUNICAZIONI A CONGRESSI:

I ANNO DI DOTTORATO:

1. 16THEUROPEAN CONGRESS OF IMMUNOLOGY; **PARIS, FRANCE 6-9-SEPTEMBER 2006.**

VARIATIONS OF THE PERFORIN GENE IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNITY/LYMPHOPROLIFERATION AND DEFECTIVE FAS FUNCTION. **Cappellano G.**, Chiocchetti A., Cerutti E., Ferretti M., Orilieri E., Dianzani I., Ramenghi U., Dianzani U. (**PRESENTAZIONE POSTER**).

2. **XXVIII CONGRESSO NAZIONALE SIP 2006 SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA, PAVIA,19-22 SETTEMBRE 2006.**

VARIAZIONI NEL GENE DI PERFORINA IN PAZIENTI CON SCLEROSI MULTIPLA. Orilieri E., **Cappellano G.**, Comi C., Chiocchetti A.,Cerutti E., Castelli L., Monaco F., Dianzani U.

3. 36th ANNUAL EUROPEAN SOCIETY FOR DERMATOLOGICAL RESEARCH MEETING. **PARIS (France) 7-9 SEPTEMBER 2006.**

DEFECTIVE FAS FUNCTION AND VARIATION OF PERFORIN GENE IN A PATIENT WITH EPIDERMODYSPLASIA VERRUCIFORMIS. Tiberio R., Petrusi G., **Cappellano G.**, Azzimanti B., Mondini M., Dell'Oste V., Colombo E, Dianzani U, Gariglio M and Leigheb G.

II ANNO DI DOTTORATO:

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

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

III ANNO DI DOTTORATO:

1. EUROPEAN BIOLPINE CONVENTION. INFLAMMATION AND AUTOIMMUNITY: BRIDGING PUBLIC AND PRIVATE RESEARCH. COLLERETTO GIOCOSA (TO) 6-7 NOVEMBRE 2007.

VARIATIONS OF THE PERFORIN GENE IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS
Giuseppe Cappellano, Cristoforo Comi, Elisabetta Orilieri, Annalisa Chiocchetti, Sara Bocca, Elena Boggio, Ilaria Seren Bernardone, Sandra Dalfonso, Mara Giordano, Franco Perla, Maurizio Leone, Francesco Monaco, and Umberto Dianzani. (**PRESENTAZIONE POSTER**)

VARIATIONS OF THE PERFORIN GENE IN PATIENTS WITH TYPE 1 DIABETES
Elisabetta Orilieri, **Giuseppe Cappellano**, Massimo Ferretti, Elisa Cerutti, Francesco Cadario, Franco Cerutti, Graziella Bruno, Annalisa Chiocchetti, and Umberto Dianzani .

2. VI SIICA NATIONAL CONFERENCE, UNIVERSITÀ LA SAPIENZA, ROMA, 11-14 GIUGNO 2008.

VARIATIONS OF THE PERFORIN GENE IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNE DISEASES.
Elisabetta Orilieri, **Giuseppe Cappellano**, Annalisa Chiocchetti and Umberto Dianzani (**PRESENTAZIONE POSTER**).

CO-INHERITED MUTATIONS OF FAS AND CASPASE 10 IN DEVELOPMENT OF THE AUTOIMMUNE LYMPHOPROLIFERATIVE SINDROME. **Giuseppe Cappellano**, Elisa Cerutti, Massimo Ferretti, Annalisa Chiocchetti, Umberto Dianzani. (**PRESENTAZIONE POSTER**)

THE 423Q POLYMORPHISM OF THE XIAP GENE INFLUENCES MACROPHAGE FUNCTION AND IS ASSOCIATED WITH IDIOPATIC PERIODIC FEVER. A. Chiocchetti , M. Gattorno, M. Ferretti, E.Orilieri, **G.Cappellano**, A. Martini, U. Dianzani.

PUBBLICAZIONI

- **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]
- Orilieri E, **Cappellano G**, Clementi R, Cometa A, Ferretti M, Cerutti E, Cadario F, Martinetti M, Larizza D, Calcaterra V, D'Annunzio G, Lorini R, Cerutti F, Bruno G, Chiocchetti A, Dianzani U. Variations of the perforin gene in patients with type 1 diabetes. **Diabetes.** 2008 Apr;57(4):1078-83. Epub 2008 Jan 15.
- Zavattaro E, Azzimonti B, Mondini M, De Andrea M, Borgogna C, Dell'Oste V, Ferretti M, Nicola S, **Cappellano G**, Carando A, Leigheb G, Landolfo S, Dianzani U, Gariglio M. Identification of defective Fas function and variation of the perforin gene in an epidermodysplasia verruciformis patient lacking EVER1 and EVER2 mutations. **J Invest Dermatol.** 2008 Mar;128(3):732-5. Epub 2007 Oct 25.
- Clementi R, Chiocchetti A, **Cappellano G**, Cerutti E, Ferretti M, Orilieri E, Dianzani I, Ferrarini M, Bregni M, Danesino C, Bozzi V, Putti MC, Cerutti F, Cometa A, Locatelli F, Maccario R, Ramenghi U, Dianzani U. Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function. **Blood.** 2006 Nov 1;108(9):3079-84. Epub 2006 May 23.