

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



Dottorato di Ricerca

in

Medicina Molecolare

Ciclo XXII

Relazione III° anno

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

Candidato: Sara Bocca

Tutor: Prof. Umberto Dianzani

1.INTRODUZIONE

1.1 IL SISTEMA IMMUNITARIO E L'APOPTOSI.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.1.2 IL SISTEMA FAS/ FAS LIGANDO (FasL).

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

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

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

L'apoptosi può essere innescata anche attraverso la via intrinseca. Il citocromo c è la molecola chiave di questa via; esso viene rilasciato dal mitocondrio nel citoplasma in seguito alla depolarizzazione della membrana mitocondriale. Il citocromo c si lega successivamente alla molecola adattatrice Apaf-1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor-1*) che, legando la pro-caspasi 9, porta alla formazione di un complesso detto apoptosoma, il quale induce l'attivazione della caspasi 9 (7,8).

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

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

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

1.2.1 LE MALATTIE AUTOIMMUNI.

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

Una caratteristica del sistema immunitario è la capacità di regolare la risposta immunitaria; in particolare quando le cellule del sistema immunitario si attivano si ha l'espressione di geni coinvolti nella proliferazione e nelle funzioni effettrici dei linfociti, ma contemporaneamente si induce anche l'espressione dei geni che determinano l'apoptosi della gran parte dei linfociti attivati, fenomeno noto come "*spegnimento della risposta immunitaria*". Questo processo è

essenziale per garantire protezione nei confronti dell'autoimmunità: se i linfociti non vanno in apoptosi dopo che gli antigeni *non-self* sono stati eliminati, c'è il rischio che riconoscano per errore antigeni *self*. Tuttavia una piccola porzione di essi non muore ma permane come cellule memoria, importanti nelle successive stimolazioni da parte dello stesso antigene (11).

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

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

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

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

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

Dal punto di vista clinico le malattie autoimmuni si dividono in sistemiche, come ad esempio la sindrome autoimmune linfoproliferativa e il lupus eritematoso sistemico, e organo-specifiche, come ad esempio il diabete mellito di tipo 1, la sclerosi multipla e la tiroidite di Hashimoto. Dal punto di vista invece del meccanismo immuno-patogenetico si distinguono in malattie mediate da anticorpi, che danno origine a danni tipicamente sistemici, e mediate da cellule, che invece determinano un danno prevalentemente organo o tessuto-specifico.

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

1.2.2 LA SINDROME AUTOIMMUNE LINFOPROLIFERATIVA (ALPS).

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

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

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

La diagnosi di ALPS viene eseguita in base alla presenza di linfadenopatia non maligna, splenomegalia, presenza di linfociti T DN circolanti superiori al 2%, difetti dell'apoptosi da parte di linfociti attivati *in vitro* (16). Spesso in aggiunta, sono riscontrabili altre malattie autoimmuni, una storia familiare positiva per l'ALPS e mutazioni a carico del gene per Fas (17,18).

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

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

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

ALPS Ia con mutazioni a carico del gene di Fas,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

L'attivazione di SLAM con anticorpi agonisti promuove la proliferazione e la produzione di citochine, tra cui di interferone γ (IFN- γ) da parte di linfociti T Helper di tipo uno (T_{H1}), linfociti citotossici (Tc), cellule NK (Natural Killer), anche in assenza della

stimolazione del TCR; inoltre converte la risposta dei cloni linfocitari T Helper di tipo due (T_{H2}) verso quella tipica dei feotipi T_{H1} o T Helper tipo zero (T_{H0}) (31).

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

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

(CD150) ma non agli altri recettori della famiglia, anche in assenza di fosforilazione (41) . SAP può associarsi grazie al suo dominio SH2 ad ognuno dei tre siti consensus presenti su SLAM e in

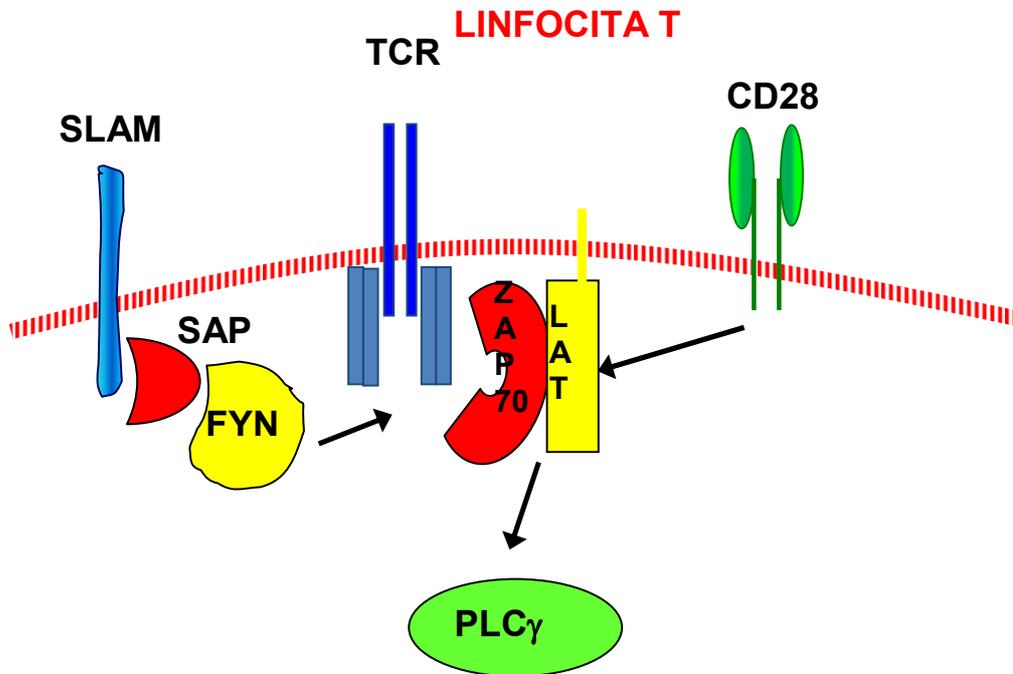


Figura 1: Modello di trasduzione del segnale in seguito all'interazione tra SLAM-SAP.

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

Esistono alcune evidenze secondo le quali i recettori della famiglia SLAM potrebbero mediare la loro funzione anche in assenza di SAP: (i) nei macrofagi SAP non è espresso e la sua presunta

funzione verrebbe ricoperta da EAT-2 che è però privo del dominio con cui SAP attiva Fyn; (ii) è stato osservato che il reclutamento di 2B4 attraverso anticorpi, in cellule NK di pazienti affetti da XLP, inibisce la citotossicità NK mediata; (iii) altri recettori della famiglia SLAM sono in grado di associare a proteine come SHP-2 e di mediare specifici segnali biochimici come l'attivazione di Akt anche in assenza di SAP (34).

1.3.1 SAP E L'AUTOIMMUNITA'

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

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

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

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

I topi MRL-Fas^{lpr} (modello animale del LES), presentano un deficit di Fas, linfadenopatia, produzione di autoanticorpi e glomerulonefrite. La presenza della sola mutazione lpr è insufficiente a causare il difetto, per cui altri geni modificatori intervengono nello sviluppo della malattia. Studi genetici hanno dimostrato che una perdita di espressione di SAP può attenuare la linfadenopatia e le complicazioni della malattia. (48)

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

2. SCOPO DEL LAVORO.

La sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS) è una malattia geneticamente eterogenea. Alla base vi è il deficit funzionale della via di trasduzione Fas-mediata e tra i fattori genetici che concorrono allo sviluppo della malattia, vi sono mutazioni nei geni che codificano per Fas (ALPS Ia),

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

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

3.MATERIALI E METODI

3.1 PAZIENTI

Nel nostro studio abbiamo analizzato 16 pazienti con ALPS (10 maschi e 6 femmine), 25 pazienti DALD (17 maschi e 8 femmine) e 324 controlli sani, etnicamente correlati, provenienti dal Dipartimento di Scienze Mediche dell’Università del Piemonte Orientale. I prelievi di sangue periferico sono stati ottenuti da pazienti e controlli sotto consenso informato. Lo studio è stato effettuato secondo le linee guida del comitato etico locale

3.2 ESTRAZIONE DI DNA DA SANGUE.

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

Successivamente, sono stati aggiunti nel seguente ordine: *Lysis Buffer* (10 mM TRIS pH 8.2, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA), SDS 20% (25 µl per ogni ml di *Lysis Buffer*) e Proteinasi K (20 mg/ml: 25 µl per

ogni ml di *Lysis Buffer*). I campioni sono stati successivamente incubati a 37°C, in agitazione, per 16 ore. Il “salting-out” delle proteine è stato ottenuto con l’aggiunta una soluzione NaCl 6M. Le proteine precipitate sono state rimosse mediante centrifugazione per 20 min a 2500 rpm.

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

3.3 MISURAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI ALLO SPETTROFOTOMETRO

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

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

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

Un ulteriore lettura a 280 nm viene utilizzata per valutare la purezza del DNA o dell’RNA; il rapporto ottimale OD₂₆₀/ OD₂₈₀ per il DNA è pari a 1,8, mentre per l’RNA è pari a 2.

3.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)

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

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

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

La miscela di reazione è composta dal tampone di reazione (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0,5 μ M di ciascun oligonucleotide, 0,2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi, e 1U Taq DNA polimerasi (5U/ μ l) (Invitrogen). Le reazioni di PCR necessitano per avvenire di $MgCl_2$: esso è concentrato 1.5 mM nella reazione di amplificazione. Le condizioni di reazione sono le seguenti:

94°C 5'

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

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

3.5 ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO

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

3.6 SEQUENZIAMENTO AUTOMATICO

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

Le reazioni di sequenziamento sono quindi state ottenute servendosi del kit specifico ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v1.1 (Applied Biosistem), dotati di

dideossinucleotidi ciascuno legato ad un fluorocromo differente. Seguendo il protocollo consigliato dalla ditta, per un volume finale di reazione di 10 μ l, sono stati addizionati al DNA purificato, 2 μ l di BigDye Sequencing Buffer (in dotazione con il kit) , il primer (3,2 μ M/ μ l). - La reazione di sequenziamento prevede l'utilizzo del seguente programma:

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

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

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

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

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

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

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

3.8 SAGGI FUNZIONALI.

Per valutare i livelli trascrizionali di SAP, i PBMC sono stati stimolati con 1µg/ml di fitoemoaglutinina (PHA, Sigma, St Louis, MO) al T0 e mantenuti in terreno di coltura per 12 giorni in RPMI 1640 (Gibco, New York, USA) addizionato di 1% L-Glutammina, Antibiotici (Penicillina, Streptamicina, Gentamicina) e 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco, New York, USA). e IL-2 (2 U/mL) (Biogen).

3.9 RT-PCR e REAL-TIME

Per gli esperimenti di Real Time è stato isolato l'RNA totale da colture di PBMC utilizzando un kit commerciale Nucleospin RNAII (Machery-Nagel, Germany). L'RNA (500ng) è stato retrotrascritto con il kit Thermoscript™ RT PCR System (Invitrogen, Burlington, ON Canada). L'espressione di SAP è stata valutata con un saggio di espressione genica Assay on Demand (Applied Biosystem (Assay No. Hs99999139_m1 e Assay No. Hs001677093_m1 rispettivamente). Il gene housekeeping GAPDH (Assay No. Hs99999905_m1) è stato utilizzato per normalizzare le variazioni del cDNA. La reazione di Real Time è stata condotta nello strumento 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem), ogni campione è stato analizzato in duplicato impiegando 2 µl di cDNA diluito, 10 µl di PCR master mix (Applied Biosystem) e 1 µl di Assay on Demand mix. Il ciclo di PCR utilizzato prevede 10 min a 95C, seguiti da 40 cicli a 95C per 15 sec e a 60C per 1 min. I risultati sono stati analizzati con il metodo delle curve standard.

3.10 ANALISI STATISTICA

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

4. RISULTATI

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

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

La regione del DNA corrispondente al promotore è stata amplificata mediante PCR e sottoposta ad analisi tramite sequenziamento diretto per cercare mutazioni e polimorfismi noti e non noti, inizialmente, in 16 pazienti con ALPS (10 maschi e 6 femmine) e 25 pazienti DALD (17 maschi e 8 femmine).

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

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

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

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

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

Pertanto abbiamo esteso l'analisi a 324 controlli sani per valutare se la frequenza di questo polimorfismo fosse diversa nei pazienti e nei controlli, un dato che suggerirebbe un suo possibile

coinvolgimento nella malattia. La frequenza dell'allele -346T è risultata maggiore nei pazienti rispetto ai controlli (57% vs 33%; $P=0.000045$, $P_{\text{corr}}=0.00135$). Tutti i valori analizzati sono stati corretti secondo il metodo di Bonferroni, moltiplicando il valore per il numero di SNPs testati ($n^{\circ}=3$).

Suddividendo la popolazione in maschi e femmine si può notare come l'allele -346T sia significativamente più frequente nei pazienti maschi emizigoti rispetto ai controlli (67% vs 33%; $P=0.0014$, $P_{\text{corr}}=0.0042$), aumentando di 4 volte il rischio di sviluppare la malattia, invece nelle femmine la frequenza è paragonabile nelle due popolazioni.

(Tabella 3).

-346C/T							
		C		T		OR (95%CI)	p
	Sesso	n	%	n	%		
CONTROLLI	Totale (n=324)	430	67	218	33		
	M (n=203)	136	67	67	33		
	F (n=121)	158	65	84	35		
ALPS/DALD	Totale(n=41)	35	43	47	57	2.65 (1.62-4.34)	0.000045 [§]
	M (n=27)	9	33	18	67	4.06 (1.62-10.39)	0.0014 [§]
	F (n=14)	17	61	11	39		

Tabella. 3. Distribuzione della frequenza del polimorfismo -346C/T nelle popolazioni ALPS/ DALD e controlli. [§] P value non corretto per il numero di comparazioni.

La regione del promotore presenta altri due polimorfismi il -631 G/A e il -494 G/A; la frequenza genotipica di quest'ultimo non presenta differenze significative nelle due popolazioni, mentre l'allele

-631A ha una distribuzione più frequente nei pazienti maschi rispetto ai controlli (67% vs 33%; $P=0.002$, $P_{\text{corr}}=0.006$), aumentando di circa 4 volte il rischio di sviluppare la malattia, invece nelle femmine la frequenza è paragonabile nelle due popolazioni. Tutte le distribuzioni genotipiche non differiscono significativamente dall'equilibrio di Hardy-Weinberg.

Successivamente ci siamo chiesti se le frequenze di questi SNPs fossero differenti negli ALPS e nei DALD; quindi suddividendo ulteriormente le due patologie si può notare come la frequenza dell'allele -346T rimanga più elevata nei pazienti rispetto ai controlli (ALPS 56% vs 33%; $P=0.013$; DALD 58% vs 33%; $P=0.00076$), e risultati analoghi si ottengono se dividiamo i gruppi per maschi e femmine.

Anche per l'allele -631A la frequenza rimane più elevata nei pazienti rispetto ai controlli, sebbene negli ALPS non risulti significativa (DALD 62% vs 34%; $P=0.00021$).

In questo caso le popolazioni non sono state corrette per Bonferroni visto il numero ridotto di soggetti.

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

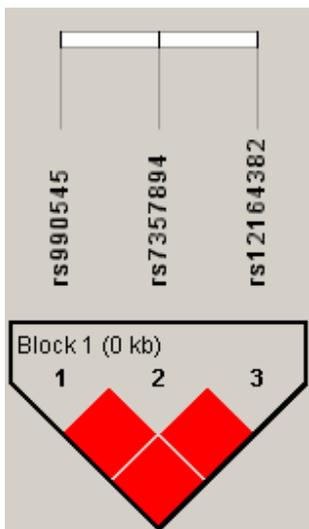


Figura .2. Linkage disequilibrium tra i polimorfismi del promotore di SAP.

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

Tabella 4. Combinazioni aplotipiche in pazienti e controlli

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

Aplotipo #	-631	-494	-346	ALPS/DALD (n=41) Frequenza	CONTROLLI(n=324) Frequenza	P	OR	95% CI
1	G	A	C	0.23	0.46	0.00018 ^ζ	2.77	1.58-4.91
2	A	G	T	0.60	0.33	0.0000037 ^ζ	3.01	1.83-4.95
3	G	G	C	0.13	0.20	ns	-	-
4	A	G	C	0.04	0.01	ns	-	-

Tabella 5. Frequenze aplotipiche. [§] P value non corretto per il numero di comparazioni.

4.2 Associazione del polimorfismo -346C/T con i livelli di SAP.

Al fine di analizzare se il polimorfismo -346C/T influenza l'espressione o la funzionalità di SAP, abbiamo analizzato la produzione di RNA messaggero, in PBMC, derivati da sangue periferico di soggetti di controllo sani, portatori dell'una o dell'altra variante, di sesso maschile. Tali cellule sono

state attivate al T0 e tenute in coltura fino al T12 per valutare la massima espressione di SAP. Tale esperimento valutato con la tecnica della Real-Time PCR, ha dimostrato che i portatori della variante -346T (n=4) producono più alti livelli di RNA messaggero rispetto ai portatori della variante -346C (n=4) (p=0.028) (**Figura 3**).

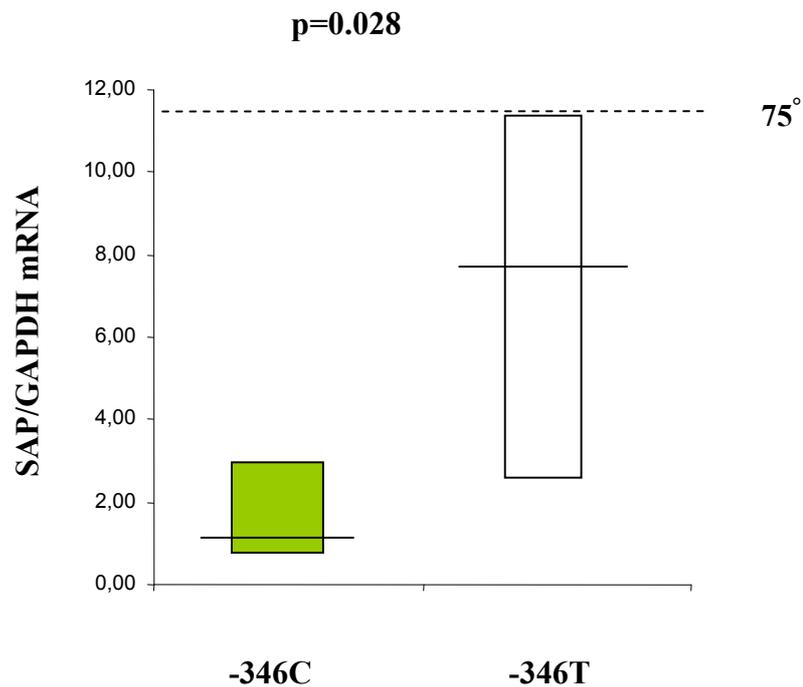


Figura 3. Espressione dell'RNA messaggero codificante per SAP in maschi emizigoti per le due varianti. I valori sono stati normalizzati a quelli del gene della GAPDH. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney U-test. La linea alta tratteggiata più alta indica il limite superiore della norma calcolato come 75° percentile sulla popolazione, le linee orizzontali rappresentano la loro mediana

5. DISCUSSIONE

SAP (Slam Associatine Protein, chiamato anche SH2D1A) , è una piccola proteina di 15kDa costituita da un dominio SH2 e da una corta coda di 26 aminoacidi all'estremità C-terminale che presenta due tiroxine fosforilabili (34). Mentre SAP è espresso prevalentemente nei linfociti T, nelle cellule NK, negli eosinofili ed in altre cellule B, il suo ruolo in macrofagi è delegato alla proteina omologa EAT-2 (38). SAP ed EAT-2 che rappresentano gli interattori principali della famiglia dei recettori SLAM, condividono un meccanismo simile di riconoscimento ed interazione con la propria sequenza consenso, ma mentre il legame di EAT-2 al recettore avviene solamente quando le tiroxine sono fosforilate, SAP esibisce la peculiare capacità di associare a SLAM (CD 150) ma non agli altri recettori della famiglia, anche in assenza di fosforilazione (41). SAP può associarsi grazie al suo dominio SH2 ad ognuno dei tre siti consensus presenti su SLAM e in particolare può legare i motivi contenenti le tirosine 307 e 327 se fosforilate e il motivo contenente la tirosina 281 anche in assenza di fosforilazione (39,42). Inoltre, SAP è in grado di legare contemporaneamente la tirosina chinasi Fyn, che è richiesta per l'attivazione di SLAM (43,44,45). Nel linfocita quiescente è presente quindi un complesso stabile SLAM/SAP/FYN che in seguito alla stimolazione con anticorpi agonisti si modifica promuovendo la fosforilazione delle ITSM ed il reclutamento di altri effettori come l'inositolo fosfatasi SHIP-1, gli adattatori Shc, Dok1 e Dok2 e scambiatori guaninici come RasGAP (38,32,46). Questo complesso multiproteico promuove la produzione di citochine in associazione con il segnale generato dal TCR: infatti le vie di trasduzione del segnale utilizzate dai membri della famiglia di SLAM e dal TCR si sovrappongono e si rinforzano ampiamente per generare un'appropriata risposta immune.

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

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

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

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

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

La regione del DNA corrispondente al promotore è stata amplificata mediante PCR e sottoposta ad analisi tramite sequenziamento in 16 pazienti con ALPS (10 maschi e 6 femmine) e 25 pazienti con DALD (17 maschi e 8 femmine); i risultati del sequenziamento non hanno evidenziato nessuna mutazione, ma ha rilevato tre polimorfismi (-631 G/A; -494 G/A; -346 C/T) già presenti in banca dati (<http://snpper.chip.org>). Un’analisi in silico e della letteratura ha evidenziato che queste tre variazioni non modificano siti di legame di fattori trascrizionali, ma la variazione -346 C/T appare di interesse in quanto è localizzata in un possibile sito di metilazione e potrebbe pertanto modificare l’espressione del gene (49). La metilazione è una modificazione epigenetica del DNA che altera l’accessibilità fisica al genoma da parte di complessi molecolari deputati all’espressione genica. Questa variazione potrebbe legare o inibire il legame con fattori di trascrizione e modulare, di conseguenza, l’espressione della proteina.

Pertanto abbiamo esteso l’analisi a 324 controlli sani per valutare se la frequenza di questo polimorfismo fosse diversa nei pazienti e nei controlli, un dato che suggerirebbe un suo possibile coinvolgimento nella malattia. La frequenza dell’allele -346T è risultata maggiore nei pazienti rispetto ai controlli (57% vs 33%; $P=0.000045$, $P_{\text{corr}}=0.00135$). Tutti i valori analizzati sono stati corretti secondo il metodo di Bonferroni, moltiplicando il valore per il numero di SNPs testati ($n^{\circ}=3$).

Suddividendo la popolazione in maschi e femmine si può notare come l’allele -346T sia significativamente più frequente nei pazienti maschi emizigoti rispetto ai controlli (67% vs 33%; $P=0.0014$, $P_{\text{corr}}=0.0042$), aumentando di 4 volte il rischio di sviluppare la malattia, mentre nelle femmine la frequenza è paragonabile nei pazienti e nei controlli.

La regione del promotore presenta altri due polimorfismi il -631 G/A e il -494 G/A; la frequenza genotipica di quest'ultimo non presenta differenze significative nelle due popolazioni, mentre l'allele -631A ha una distribuzione più frequente nei pazienti maschi rispetto ai controlli (67% vs 33%; $P=0.002$, $P_{\text{corr}}=0.006$), aumentando di circa 4 volte il rischio di sviluppare la malattia, invece nelle femmine la frequenza è paragonabile nelle due popolazioni. Tutte le distribuzioni genotipiche non differiscono significativamente dall'equilibrio di Hardy-Weinberg.

Successivamente ci siamo chiesti se le frequenze di questi SNPs fossero differenti negli ALPS e nei DALD; quindi suddividendo ulteriormente le due patologie si può notare come la frequenza dell'allele -346T rimanga più elevata nei pazienti rispetto ai controlli (ALPS 56% vs 33%; $P=0.013$; DALD 58% vs 33%; $P=0.00076$) e risultati analoghi si ottengono se dividiamo i gruppi per maschi e femmine.

Anche per l'allele -631A la frequenza rimane più elevata nei pazienti rispetto ai controlli, sebbene negli ALPS non risulti significativa (DALD 62% vs 34%; $P=0.00021$).

In questo caso le popolazioni non sono state corrette per Bonferroni visto il numero ridotto di soggetti. Abbiamo quindi valutato se lo SNP -346C/T fosse in linkage disequilibrium con gli altri due SNPs del promotore utilizzando un software statistico (Haploview) che calcola le possibili combinazioni aplotipiche in base ai dati ottenuti dal sequenziamento. I risultati indicano che i tre SNP si possono associare in quattro aplotipi (1, 2, 3 e 4) che rappresentano circa il 99% delle possibili combinazioni aplotipiche. Le frequenze di questi aplotipi nei controlli e nei pazienti sono mostrati nella Tabella 5. L'aplotipo 2, caratterizzato in modo esclusivo dallo SNP -349T, risulta essere più frequente nei pazienti mentre gli aplotipi 1 e 3 nei controlli; l'aplotipo 4 ha una frequenza relativamente bassa in entrambe le popolazioni.

Al fine di analizzare se il polimorfismo -346C/T influenza l'espressione o la funzionalità di SAP, abbiamo analizzato la produzione di RNA messaggero in PBMC derivati da sangue periferico di soggetti maschi di controllo sani, portatori dell'una o dell'altra variante. Tali cellule sono state attivate con PHA e tenute in coltura per 12 giorni per indurre una massima espressione di SAP che è stata poi valutata mediante Real-Time PCR. Questi esperimenti hanno dimostrato che i portatori della variante -346T ($n=4$) producono più alti livelli di RNA messaggero rispetto ai portatori della variante -346C ($n=4$) ($p=0.028$).

I dati ottenuti suggeriscono pertanto che una aumentata espressione di SAP sembra favorire lo sviluppo di ALPS/DALD. Questa possibilità è in linea con quanto descritto da Komori et al. in un lavoro in cui si dimostra che la perdita di espressione di SAP dovuta a una mutazione puntiforme spontanea è in

grado di proteggere dallo sviluppo della malattia i topi MRLlpr/lpr che sono il classico modello murino dell'ALPS (50)

Un aspetto peculiare dei nostri dati è l'apparente selettività dell'effetto della variazione di SAP nei soggetti maschi. Questo risultato potrebbe essere casuale e legato al ridotto numero di pazienti femmine analizzate e al maggior numero di genotipi presentato da quest'ultime. Tuttavia non si può escludere che il dato identifichi effettive differenze nella malattia sviluppata dai due sessi. Questa possibilità sembra essere in linea con un'osservazione di Rosai et al. i quali hanno dimostrato che i linfonodi di maschi con ALPS presentano frequentemente alcuni aspetti istologici tipici della sindrome di Rosai-Dorfman, che sono invece rari nelle pazienti femmine (51), quali una proliferazione non neoplastica di cellule istiocitiche/fagocitiche all'interno dei seni linfonodali.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Nat R., E. Radu, T. Regalia and L. M. Popescu Apoptosis in the immune system: Fas-induced apoptosis in monocytes-derived human dendritic cells. *J. Cell. Mol. Med.*, 2002; 6:223-234.
2. Peng Y., Martin D., Kenkel J., Zhang K., Ogden C., and Elkon K. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells, *J Autoimm.*, 2007; in press.
3. Ashkenazi A., Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998; 281:1305-1308.
4. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien, RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*, 2000; 288:2354-2357.
5. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 1997; 88:355-36.
6. Los M, C. Stroh, R. U. Janiche, I. H. Engels, K. Schulze-Osthoff Caspases: more than just killers? *Trends in Immunology*, 2001 22:
7. Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312, 1998.
8. Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssiere J.C., Mignotte B.: The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.*, 1995; 9:277-1287.

9. Kumar S. Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Diff.* 6, 1060-1066, 1999.
10. Rieux-Laucat F., F. Le Deist and A. Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death and Differentiation Nature* 2003; 10:124-133.
11. Tsonis IA, Avrameas S, Moutsopoulos HM. Autoimmunity and pathophysiology. *J. Autoimmun.* 2007 [Epub ahead of print]
12. Kuijf ML., Godschalk PC., Gilbert M., Endtz HP., Tio-Gillen AP., Ang CW., van Doorn PA. And Jacobs BC Origin of ganglioside complex antibodies in Guillan-Barrè syndrome. *J. Neuroimmunol.* 2007;2:69-73.
13. Canale VC, Smith CH. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr.* 1967;70:891-899.
14. Straus S. E., M. Sneller, M. J. Lenardo, J. m. Puck and W. Strober An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Annals of Internal Medicine*, 1999;130:591-601.
15. Bleesing J. J. H., M. R. Brown, S. E. Straus, J.K Dale, R. M. Siegel, M. Jonhson, M.J. Lenardo, J.M. Puck and T. A. Fleisher, Immunophenotypic profiles in family with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*, 2001,98:2466-2473.
16. Lopatin U., R. K. Williams, J. J. H. Bleesing, J. K. Dale, D. Wong, J. T. Feldstein, S. Fritz, M. R: Morrow, I. Fuss, M. C. Sneller, M. Raffeld T. A. Fleisher, J. M. Puck W. Strober, E. S. Jaffe and S. S. E. Straus Increases in circulating and lymphoid tissue interleukin-10 in autoimmune lymphoproliferative syndrome are associated with diseases expression. *Blood*, 2001,97:3161-3170.
17. Campagnoli M.F., L. Garbarini, P.Quarello, E. Garelli, A. Carando, V. Baravalle, A, Doria, A, Biava, A. Chiocchetti, A. Rosolen, C. Dufur, U. Dianzani and U. Ramenghi The broad spectrum of autoimmune lymphoproliferative disease: molecular bases, clinical features and long-term follow-up in 31 patients. *Haematologica*, 2006;91:538-541.
18. Martin D.A., L. Zheng, R. M. Siegel, B. Huang, G.H. Fisher, J. Wang, C.E: Jackson, J.M. Puck, J. Dale, S. E. Straus, M. E. Peter, P. H. Krammer, S. Fesik and M.J, Lenardo Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia *PNAS*; 1999,96: 4552-4557.
19. A. van den Berg, E. Maggio, A. Diepstra, D. de Jong, J. van Krieken and S. Poppema Germline Fas gene mutation in a case of ALPS and NLP Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2002;99:1492-1494.
20. Oliveira JB, N. Bidere, JE. Niemela, L. Zheng, K. Sakai, CP. Nix, RL. Danner, J. Barb, PJ. Munson, JM. Puck, J. Dale, SE. Straus, TA. Fleisher and MJ. Lenardo NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome *PNAS*, 2007; 21:8953-8958.

21. Benihoud K, Bonardelle D, Bobe P, Kiger N. MRL/lpr CD4⁻ CD8⁻ and CD8⁺ T cells, respectively, mediate Fas-dependent and perforin cytotoxic pathways. *Eur J Immunol.*, 1997; 27:415-420.
22. Renkl AC, Wussler J, Ahrens T, Thoma K, Kon S, Uede T, Martin SF, Simon JC, Weiss JM Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype. *Blood.* 2005 Aug 1;106(3):946-55. Epub 2005 Apr 26.
23. Jackson C. E., R. E. Fischer, A.P Hsu, S. M. Anderson, Y. Choi, J. Wang, J.K Dale, T. A. Fleisher, L.A. Middleton, M. C. Sneller, M.J. Lenardo, S. E. Straus and J.M. Puck Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance *Am. J. Hum. Gen.* 1999,64:1002-1014.
24. Ramenghi U., S. Bonisconi, g. Migliaretti, S. DeFranco, F. Bottarel, C. Gambaruto, D. DiFranco, R. Priori, F. Conti, I. Dianzani, G. Valesini, F. Merletti and U. Dianzani Deficient of apoptosis pathway without fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. *Blood*, 2000;95,3176-13182.
25. Veillette A. (2006) *Nat Immunol* **6**, 56-66
26. Veillette A., S. Latour (2003) *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 277–285
27. Engel P., Eck M.J., Terhorst C., (2003) *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 813–821
28. Nanda N., Andre P., Bao M., Clauser K., Deguzman F., Howie D., Conley P.B., Terhorst C., Phillips D.R. (2005) *Blood.*, **106**, 3028-3034
29. Cocks B.G., Chang, C., Carballido J.M., Yssel H., de Vries J.E, Aversa G (1995) *Nature* **376**, 260-263
30. Wang N., Satoskar A., Faubion W., Howie D., Okamoto S., Feske S., Gullo C., Clarke K., Roriguez Sosa M., Sharpe A., Terhorst C. (2004) *J Exp Med* **199**, 1255–1264
31. Veillette A. Dong Z., Latour S. (2007) *Immunity* **27**, 698-708
32. Latour S., Veillette A (2003) *Immun Rev* **192**, 212-224
33. Howie D., Simarro M., Sayos J., Guirado M., Sancho J., Terhorst C. (2002) *Blood* **99**, 957-965.
34. Veillette A. (2004) *J Exp Med.* **199**, 1175-1178
35. Howie D., Sayos j., Terhorst C., Morra M. (2000) *Curr Opin Immunol* **12**, 474–478
36. Morra M., Lu J., Poy F., Martin M., Sayos J., Calpe S., Gullo C., Howie D., Rietdijk S., Thompson A., Coyle A. J., Denny C., Yaffe M. B., Engel P., Eck M. J., Terhorst C. (2001) *EMBO J* **20**, 5840-5852

37. Nichols K. E., Ma C. S., Cannons J. L., Schwartzberg P. L., Tangye S. G. (2005) *Immunol Rev* **203**, 180-199
38. Ma C.S., Nichols K.E., Tangye S.G. (2007) *Annu Rev Immunol* **25**, 337-379
39. Sanzone S., Zeyda M., Saemann M.D., Soncini M., Holter W., Fritsch G., Knapp W., Condotti F., Stulnig T.M., Parolini O. (2003) *J Biol Chem* **278**, 29593-29599
40. Ma C.S., Hare N.J., Nichols K.E., Dupré L., Andolfi G., Roncarolo M., Adelstein S., Hodgkin P.D. Tangye S.G. (2005) *J Clinical Inv*, **115**, 1049-1059
41. Howie D., Simarro M., Sayos J., Guirado M., Sancho J., Terhorst C. (2002) *Blood* **99**, 957-965.
42. Hwang P. M., Li C., Morra M., Lillywhite J., Muhandiram D. R., Gertler F., Terhorst C., Kay L. E., Pawson T., Forman-Kay J. D., Li S. C. (2002) *EMBO J* **21**, 314-23
43. . Latour .S., Gish G., Helgason C.D., Humphries R.K., Pawson T., Veillette A. (2001) *Nature Immunol* **2**, 681-690
44. Latour .S., Roncagalli R., Chen R.,Bakinowski M., Shi X., Schwartzberg P.L., Davidson D., Veillette A. (2003) *Nat Cell Biol* **2**, 149-154
45. Cannons J.L., Yu L.J., Hill B., Mijares L.A., Dombroski D., Nichols K.E., Antonellis A., Koretzky G.A., Gardener K., Schwartzberg P.L. (2004) *Immunity* **21**, 693-706
46. Sylla B.S., Murphy K., Cahir-McFarland E, Lane W.S., Mosialos G., Kieff E. (2000) *Proc Nat Acad Sci USA* **97**, 7470-7475
47. Peng L., Target identification and validation in systemic autoimmunity. *ImmunolRes*.2005;32(13):2019.
48. Chan AY, Westcott JM, Mooney JM, Wakeland EK, Schatzle JD. The role of SAP and the SLAM family in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2006 Dec;18(6):656-64. Epub 2006 Sep 29.
49. Parolini O.,Weinhausel A., Kagerbauer B., Sassmann J., Holter W., Gadner H., Haas O., Knapp W. Differential methylation pattern of the X-linkd lymphoproliferative (XLP) disease gene SH2 D1A correlates with the cell lineage-specific trascription. *Immunogenetics* 2003 55:116-121
50. Komori H, Furukawa H, Mori S, Ito MR, Terada M, Zhang MC, Ishii N, Sakuma N, Nose M, Ono M.A signal adaptor SLAM-associated protein regulates spontaneous autoimmunity and Fas-dependent lymphoproliferation in MRL-Faslpr lupus mice. *J Immunol*. 2006 Jan 1;176(1):395-40
51. Maric I, Pittaluga S, Dale JK, Niemela JE, Delsol G, Diment J, Rosai J, Raffeld M, Puck JM, Straus SE, Jaffe ES.Histologic features of sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am J Surg Pathol*. 2005 Jul;29(7):903-11.

SEMINARI INTERNI AL DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

Anno Accademico 2008/09

Production of biopharmaceuticals in plants

Prof. L. Santi

5/12/08

Utilizzo delle cellule staminali mesenchimali nelle malattie neurologiche

Prof. A. Uccelli

12/12/08

La malattia celiaca

Prof. R. Troncone

9/01/09

Porpora trombocitopenia autoimmune: nuovi orientamenti fisiopatologici e terapeutici

Prof. F. Zaja

13/01/09

Interazioni geni-ambiente nell'eziologia della sclerosi multipla: studi su gemelli

Prof. M. Salvetti

27/01/09

Non solo motoneuroni: il contributo del muscolo scheletrico alla patogenesi della sclerosi laterale amiotrofica

Prof. A. Musarò

10/2/09

Ruolo dei polimorfismi dei geni della pigmentazione nell'induzione di mutazioni somatiche nei melanomi

Prof.ssa. G. Bianchi Scarrà

12/2/09

The use of the cytomegalovirus as a novel vaccine vector for Simian immunodeficiency virus

Prof. Jay A. Nelson

19/2/09

When a fine tuner of signaling pathway becomes a dangerous amplifier: the case of the proline isomerase Pin1 in cancer

Prof. G. Del Sal

20/2/09

Il metabolismo degli endocannabinoidi e la sua rilevanza terapeutica

Prof. M. Maccarone

26/2/09

La proteomica un nuovo modo di guardare al mondo delle proteine

Prof. P Pucci

18/3/09

Cellule staminali tumorali implicazioni terapeutiche

Prof. G. Stassi

18/3/09

Le nanotecnologie applicate alla medicina

Prof. Peluso

19/3/09

Regulation of integrin functions in vascular system

Prof. F. Bussolino

26/3/09

Carcinoma differenziato della tiroide: novità nel follow-up e nella terapia

Prof.ssa B. Biondi

2/4/09

I bioreattori nella medicina rigenerativa: dalla ricerca alla realtà di una start-up

Dott.ssa S. Mantero

9/4/09

Patologie dei tumori neuro-cerebrali: recenti acquisizioni in tema di diagnosi e prognosi

Dott. D. Schiffer

22/4/09

Polycystin-1 , the product of the PDK1 gene mutated in Autosomal Dominant Polycystic Disease (ADPKD) is an orphan receptor regulating cell migration and polarity

Dott.ssa A. Boletta

28/4/09

Polarized inflammation in tumor development

Prof. A. Sica

30/4/09

Effetti anti-steatogeni ed anti-tumorali degli agonisti del recettore dell'ormone tiroideo

Prof. A. Columbo

5/5/09

Integrated nanoparticle- biomolecule hybrid system: design of stimuli-responsive nanomaterials for cancer diagnosis and therapy

Dott.ssa B. Palazzo

6/5/09

Ipercolesterolemia e progressione di malattia in patologia umana

Prof. G. Poli

12/5/09

Neutotossicità delle proteine misfolded nelle malattie del motoneurone

Prof. A. Poletti

12/5/09

Functional genomics of brain

Prof. S. Gustincich

13/5/09

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI:

th

5 NATIONAL CONFERENCE SIICA

ITALIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY CLINICAL, IMMUNOLOGY AND ALLERGOLOGY

6-9 giugno 2007, Trieste

th

6 NATIONAL CONFERENCE SIICA

ITALIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY CLINICAL, IMMUNOLOGY AND ALLERGOLOGY

11-14 giugno 2008, Roma

1th COURSE IN INTEGRATION OF CYTOGENETICS, MICROARRAYS AND MASSIVE SEQUENCING IN BIOMEDICAL AND CLINICAL RESEARCH 18-22 ottobre 2009, Bologna.

COMUNICAZIONI A CONGRESSI:

th

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

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

Involvement of the ICOS gene in development of autoimmune diseases.

th

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

POSTER: Sara Bocca, Luca Castelli, Riccardo Mesturini, Annalisa Chiocchetti, and Umberto Dianzani; Involvement of the ICOS gene in development of autoimmune diseases

PUBBLICAZIONI

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

Cappellano G, Orilieri E, Comi C, Chiocchetti A, **Bocca S**, Boggio E, Bernardone IS, Cometa A, Clementi R, Barizzone N, D'Alfonso S, Corrado L, Galimberti D, Scarpini E, Guerini FR, Caputo D, Paolicelli D, Trojano M, Figà-Talamanca L, Salvetti M, Perla F, Leone M, Monaco F, Dianzani U. Variations of the perforin gene in patients with multiple sclerosis. **Genes Immun.** 2008 May 22. [Epub ahead of print]

Elena Boggio, Manuela Indelicato, Elisabetta Orilieri, **Sara Bocca**, Riccardo Mesturini, Chiara Sarasso, Maria Clorinda Mazzarino, Maria Francesca Campagnoli, Ugo Ramenghi, Umberto Dianzani, and Annalisa Chiocchetti ROLE OF TIMP-1 IN DEVELOPMENT OF AUTOIMMUNITY- LYMPHOPROLIFERATION **JACI**, 2009, *submitted*

