

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca

in

Medicina Molecolare

Ciclo XXIII

Relazione 2° anno

TITOLO: RICERCA DI FATTORI GENETICI DI SUSCETTIBILITA' ALLE MALATTIE
AUTOIMMUNI

Candidato: Barizzone Nadia

***Tutor:* Prof.ssa Sandra D'Alfonso**

SEZIONE 1
RISULTATI SCIENTIFICI

SCOPO DEL LAVORO.....	pag. 3
INTRODUZIONE.....	pag. 3
MATERIALI E METODI.....	pag. 6
RISULTATI.....	pag. 10
DISCUSSIONE.....	pag. 22
BIBLIOGRAFIA.....	pag. 31
ATTIVITA' FORMATIVA.....	pag. 33

SCOPO DEL LAVORO

Nel corso del secondo anno di dottorato ho proseguito lo studio volto a ricercare fattori genetici di suscettibilità in diverse malattie autoimmuni con caratteristiche cliniche simili, in particolare il *Lupus Eritematoso Sistemico* (LES), la *Sclerosi Sistemica* (SSc) e la *Sindrome di Sjogren* (SS). Più specificamente sono state ricercate variazioni genetiche rare, tramite uno studio mutazionale, in due geni funzionalmente candidati: *TREX1* e *PRF1*.

INTRODUZIONE

Perforina (PRF1)

Perforina (PRF1) è una proteina di 67 kDa composta da 555 aminoacidi che si accumula nei granuli secretori dei linfociti T citotossici (CTL) e delle cellule Natural Killer (NK). E' coinvolta nella sorveglianza immunitaria, in quanto i CTL e le cellule NK riconoscono le cellule neoplastiche o quelle infettate da virus e le distruggono attraverso il rilascio dei granuli, attivando il meccanismo apoptotico mediato da caspasi. PRF1 polimerizza sulla membrana delle cellule bersaglio, e forma pori che permettono l'entrata dei Granzimi all'interno della cellula. I Granzimi sono una classe di serina proteasi, che inducono la morte cellulare attraverso il clivaggio enzimatico di substrati intracellulari. Il Granzima B ha la più forte azione pro-apoptotica, ed è in grado di attivare direttamente le caspasi, mentre l'azione del Granzima A è caspasi indipendente (figura 1).

La struttura tridimensionale della perforina non è ancora nota. A livello di sequenza si identifica: un dominio (MACPRF) ad alfa-elica anfipatica, omologo alle proteine del complemento che costituiscono il Membrane Attack Complex, che si inserisce nel doppio strato lipidico; un dominio omologo al fattore di crescita epidermico (EGF-like domain) a funzione ignota ed un dominio C-terminale di legame con la membrana Ca^{2+} -dipendente (C2 domain). Quest'ultimo dominio è omologo ad altre proteine coinvolte nel traffico vescicolare e nella traduzione del segnale dipendenti da calcio. Gli ultimi 12-20 residui aminoacidici C-terminali costituiscono un peptide segnale che viene tagliato permettendo così l'attivazione della proteina (Voskoboinik et al. 2006).

Il gene *PRF1* mappa sul cromosoma 10q22.1 ed è composto da tre esoni, il secondo ed il terzo dei quali sono codificanti. Mutazioni bialleliche con perdita di funzione sono state riscontrate nel 15-50% circa dei casi di linfocitopenia emofagocitica familiare (FHL2) (Stadt et al. 2006), una rara malattia autosomica recessiva che si manifesta in età pediatrica, caratterizzata da febbre, epatosplenomegalia e pancitopenia (Henter et al. 1991). L'FHL2 è causata dall'incapacità dei CTL di distruggere le cellule presentanti l'antigene. Ciò porta all'iperattivazione e alla proliferazione incontrollata dei linfociti T e dei macrofagi, e causa un marcato aumento dei livelli di citochine nel

sangue periferico (Fisher et al. 2007). Inoltre mutazioni in eterozigosi di *PRF1* sono state osservate anche in pazienti affetti da Linfoma Anaplastico a Grandi Cellule (ALCL), linfomi di tipo Hodgkin e Non-Hodgkin (Cannella et al. 2007, Clementi et al. 2005).

L'FLH2 è una patologia recessiva, i soggetti che riportano mutazioni in eterozigosi di *PRF1* sono generalmente sani. Tuttavia è stato osservato che alcune varianti rare in eterozigosi potrebbero favorire l'insorgenza di malattie autoimmuni. Questo fatto è stato inizialmente suggerito per la sindrome linfoproliferativa autoimmune (ALPS), una rara patologia autoimmune che insorge in età pediatrica dovuta ad un deficit funzionale di Fas (Clementi et al. 2006). Successivamente sono state riportate associazioni con le varianti di sequenza di *PRF1* anche per altre malattie autoimmuni: DALD (malattia Dianzani Autoimmune Linfoproliferativa), Diabete di tipo 1 (T1D) (Orilieri et al. 2008) e Sclerosi Multipla (SM) (Cappellano et al. 2008).

TREX1

TREX1 (Dnase III, Three Prime Repair EXonuclease) è una 3'-5' esonucleasi che ha come bersaglio preferenziale gli ssDNA. Il gene *TREX1* mappa sul cromosoma 3p21 ed è costituito da 16 esoni, di cui solo uno (esone 16) è codificante. Le DNA nucleasi hanno la funzione di mantenere la stabilità del genoma e di controllare i processi di replicazione, di riparo e di ricombinazione del DNA. Si è ipotizzato, di conseguenza, un ruolo di TREX1 nella replicazione e nel riparo del DNA. Tuttavia tale funzione non è stata confermata, in quanto nei topi knockout (*Trex1* *-/-*) non si osserva né un incremento di mutazioni spontanee né un aumentato rischio nello sviluppo del cancro. Questi topi manifestano miocarditi infiammatorie simil-autoimmuni e ridotta sopravvivenza. Il fenotipo di infiammazione cronica che si manifesta nei topi *Trex1* *-/-*, risulta in una alterazione nello sviluppo dei linfociti T con la conseguenza perdita nelle cellule T della tolleranza al self (Morita et al., 2004). Questi fatti hanno suggerito un possibile ruolo di *TREX1* nello sviluppo delle autoimmunità, in seguito confermato dall'osservazione di mutazioni a carico di *TREX1* in alcune malattie autoimmuni umane (LES e SS) (Lee-Kirsh et al., 2007). TREX1 normalmente è presente principalmente in associazione col reticolo endoplasmatico, come parte di un complesso proteico che viene attivato in seguito a stress ossidativi (SET complex). TREX1 viene traslocato nel nucleo in seguito a apoptosi o stress genotossici. Durante l'apoptosi mediata da PRF1 il Granzima A proteolizza i componenti del SET complex, tra cui TREX1, causandone l'attivazione e la traslocazione in sede nucleare (figura 1). La risposta apoptotica mediata dal Granzima A provoca la formazione di ssDNA (generati da un'endonucleasi anch'essa facente parte del SET complex), i quali diventeranno il substrato di TREX1. Inoltre TREX1 previene l'accumulo di cDNA derivante da retroelementi endogeni, che potrebbero venire riconosciuti come acidi nucleici virali,

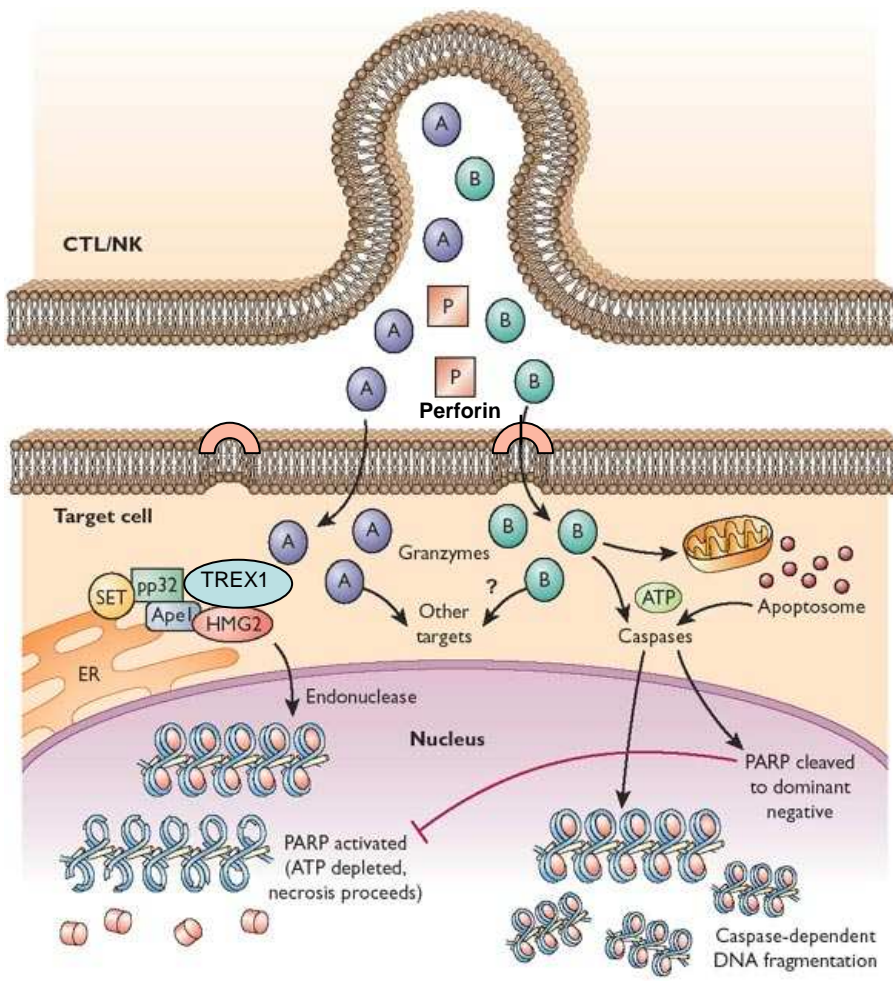
provocando così una produzione incontrollata di IFNs (interferoni). In modelli murini è stato verificato che le cellule con deficit di TREX1 accumulano ssDNA nel citosol, causando l'attivazione del pathway di IRF-3 (Vijay et al 2008, Stetson et al 2008, Yang et al).

Sono state osservate mutazioni in eterozigosi di *TREX1* in 9/417 pazienti con LES e 1/169 con SS (Lee-Kirsh, 2007). Mutazioni bialleliche di *TREX1* causano la Sindrome di Aicardi-Goutieres (AGS), una malattia autosomica recessiva che si manifesta principalmente in età pediatrica e che coinvolge il sistema neurologico e cognitivo (Rice et al. 2007). Inoltre mutazioni in eterozigosi di *TREX1* provocano due rare patologie autosomiche dominanti: il Lupus Chilblain Familiare (FCL), una rara forma familiare cutanea di lupus (Lee-Kirsh et al. 2006 e Rice et al. 2007) e la Retinal Vasculopathy and Cerebral Leukodystrophy (RVLC) (Richards et al 2007), una condizione recentemente descritta in tre famiglie, caratterizzata dalla presenza di disfunzioni cerebrali e a carico della retina (Ophoff et al. 2001).

I componenti della famiglia delle DnaQ/MutD 3'-5' esonucleasi, a cui appartiene TREX1, hanno caratteristiche strutturali particolari. Esse presentano infatti 4 residui amminoacidici non contigui, 3 aspartati e 1 glutammato, che giocano un ruolo chiave per il coordinamento di 2 Mg^{2+} essenziali per la catalisi. Un quinto residuo non conservato, che può essere una tirosina o una istidina, completa la sequenza catalitica (rappresentata come DEDDy o DEDDh, rispettivamente); questi 5 residui essenziali e conservati tra le varie specie sono distribuiti tra 3 diversi domini di sequenza, parzialmente conservate tra le specie, chiamate Exo1 – Exo2 – Exo3 che vanno a formare il sito attivo dell'enzima. La recente analisi cristallografica dell'interazione tra TREX1 murino e DNA, dimostra che TREX1 agisce come dimero, con i 2 siti attivi esposti su superfici opposte, permettendo così la potenziale interazione con 2 filamenti di DNA al 3'. Oltre ai tre domini esonucleasici, TREX1 ha una regione altamente idrofobica al carbossi-terminale chiamata TMD/TMH (Putative Transmembrane Domain), che forma un'elica transmembrana e si suppone abbia il compito di ancorare TREX1 al reticolo endoplasmatico. All'interno di TMD/TMH è infatti presente una sequenza di circa 30 amminoacidi ricca in leucine chiamata LRR3 (leucine – rich repeat 3) che influenza in vivo la localizzazione sub-cellulare: LRR3 viene tagliato per azione di specifiche proteasi, tra cui il Granzima A. Le proteasi si attivano a seguito del generarsi di uno stress ossidativo, causando la migrazione della proteina nel nucleo; nel caso le proteasi non si attivino la proteina rimane nel citoplasma, ancorata al reticolo endoplasmatico. Questa regione non fa parte del sito catalitico ma studi di mutagenesi hanno dimostrato la sua importanza nella localizzazione intracellulare. L'espressione di forme di TREX1 con delezioni in questa zona, analizzate tramite microscopia confocale, dimostrano che la forma tronca di TREX1 perde la sua

localizzazione perinucleare e si trova diffusa nel citoplasma. TREX1 presenta inoltre una sequenza ricca in proline PPII helix (Polyprolin II helix) che gioca un ruolo critico nell'interazione proteina-proteina, specificatamente con domini di tipo WW (domini conservati Trp-Trp), Src (Sarc) homology 3 e EVH1 (che legano i domini ricchi in proline; Enabled/VASP homology). La struttura di TREX1 mostra che PPII helix è esposta sulla superficie proprio per garantire l'interazione con le proteine.

Figura 1 Ruolo di PRF1 e TREX1 nella risposta apoptotica.



I granuli citotossici innescano l'apoptosi nelle cellule bersaglio attraverso il rilascio di PRF1 e dei Granzimi. PRF1 polimerizza sulla membrana cellulare, formando pori che permettono l'ingresso dei Granzimi. Il Granzima B stimola l'apoptosi direttamente attraverso l'attivazione delle caspasi o indirettamente attraverso il rilascio mitocondriale di citocromo c. Il Granzima A agisce invece sul complesso proteico SET, che contiene anche TREX1, attiva le sue componenti e ne causa la traslocazione in sede nucleare. Qui un'endonucleasi provoca la frammentazione del DNA in porzioni a singola elica, che diventeranno il substrato di TREX1 (Pinkoski & Green 2003).

MATERIALI E METODI

Casistica. Sul gene *PRF1* è stato effettuato uno screening mutazionale su 154 pazienti con LES, 131 pazienti con SSc e 559 controlli. Per due polimorfismi (p.Ala91Val and p.Asn252Ser) l'analisi è stata estesa su altri campioni per un totale di 597 LES, 204 SSc e 1856 controlli. Sul gene *TREX1* è stato effettuato uno screening mutazionale su 210 pazienti con LES, 150 con SSc e 59 con SS. Inoltre è stata ricercata la presenza di due varianti di *TREX1* emerse nel corso dello studio su una casistica di 200 controlli.

Tutti i pazienti ed i controlli appartengono alla popolazione italiana e non sono imparentati. La casistica di controlli sani comprende studenti e personale ospedaliero ed universitario e donatori di sangue. L'origine geografica di controlli e pazienti è simile. Tutti i pazienti (LES, SSc e SS) hanno fornito il loro consenso informato per lo studio.

Tutti i casi di LES (femmine: maschi = 7,5:1) presentavano almeno 4 dei criteri per la classificazione dei pazienti con LES revisionati nel 1997 dall'American College of Rheumatology (Hochberg 1997). Le caratteristiche cliniche ed immunologiche dei pazienti con LES sono riassunte nella tabella 1A.

Tutti i casi di SSc (femmine: maschi = 12:1) rispondevano ai criteri preliminari dell'American College of Rheumatology per la classificazione dei pazienti con SSc (Subcommittee for Scleroderma Criteria, 1980) e sono stati classificati nelle categorie SSc limitata o SSc diffusa. Le caratteristiche cliniche ed immunologiche dei pazienti con SSc sono riassunte nella tabella 1B.

Ricerca di nuove variazioni. Le regioni codificanti dei geni *PRF1* e *TREX1* sono state analizzate per la ricerca di nuove variazioni di sequenza. Il DNA è stato isolato da sangue periferico con metodiche standard. L'intera sequenza codificante di *PRF1* (esoni 2 e 3) è stata amplificata con condizioni standard di PCR. L'esone 2 è stato analizzato tramite sequenziamento diretto come descritto da Cappellano et al. L'esone 3 è stato amplificato in tre distinti frammenti parzialmente sovrapposti, e analizzato tramite Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) o sequenziamento diretto. L'unico esone codificante del gene *TREX1* è stato amplificato in tre frammenti distinti parzialmente sovrapposti di 375 bp, 428 bp e 466 bp. Il primo frammento è stato analizzato tramite DHPLC, gli altri due tramite sequenziamento diretto. I frammenti analizzati tramite sequenziamento diretto sono quelli contenenti polimorfismi noti o la cui analisi tramite DHPLC avrebbe richiesto un numero eccessivo di temperature. Le temperature dell'analisi con DHPLC sono state calcolate tramite l'algoritmo "DHPLC melt program" (<http://insertion.stanford.edu/melt>). I prodotti di PCR sono stati esposti a rapida denaturazione termica ed a lenta rinaturazione su di un termociclatore, quindi analizzati sullo strumento TRANSGENOMIC WAVE (Transgenomic, Omaha, NE, USA). I risultati sono stati analizzati con

il programma NavigatorTM (Transgenomic, Omaha, NE, USA). Ai fini del sequenziamento diretto, i prodotti di PCR sono stati purificati con un sistema di filtrazione a vuoto (PCR96 Cleanup kit-Millipore, Billerica, MA, USA). La reazione di sequenza è stata effettuata su un termociclatore utilizzando il kit ABI PRISM[®] BigDye Terminator kit v.1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), purificata tramite filtrazione a vuoto con il sistema Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup Kit (Millipore, Billerica, MA, USA) ed analizzata sul sequenziatore automatico 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Tipizzazione delle varianti p.Ala91Val and p.Asn252Ser. Le varianti di sequenza del gene *TREX1* p.Ala91Val e p.Asn252Ser sono state tipizzate utilizzando due saggi Taqman di discriminazione allelica pre-disegnati (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA): C__25600964_20 (p.Ala91Val) e C__27529700_10 (p.Asn252Ser) e lo strumento per la Real Time PCR ABI PRISM 7000[®] Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). I genotipi sono stati attribuiti automaticamente dal programma per la discriminazione allelica SDS 1.3.

PCR allele-specifica. L'allele wild-type (91Ala) e quello "mutante" (91Val) sono stati amplificati separatamente utilizzando un primer forward specifico (primer F 91Ala-specifico: 5'-CTCCAGCGCCTGCCTCTGGC-3', primer F 91Val-specifico: 5'-CTCCAGCGCCTGCCTCTGGT-3') ed il primer reverse appropriato. I prodotti di PCR sono stati tipizzati per la seconda variazione (p.Asn252Ser o p.Arg232His) tramite sequenziamento diretto con il kit ABI PRISM[®] BigDye Terminator kit v.1.1 ed analizzati sul sequenziatore automatico 3100 Genetic Analyser.

Analisi statistica. La significatività statistica delle differenze riscontrate tra pazienti e controlli nelle frequenze fenotipiche, alleliche e genotipiche è stata valutata utilizzando il test del Chi quadro applicando la correzione di Yates, oppure il test di Fisher a due code, se richiesto dalla numerosità del campione. L'associazione di ciascun polimorfismo con la suscettibilità alla malattia è stata misurata tramite Odd Ratio (OR) ed il suo intervallo di confidenza al 95% (95% CI). La soglia per la significatività statistica è stata fissata su valori di $p < 0,05$.

Analisi in silico. L'eventuale effetto delle variazioni sinonime sullo splicing è stato valutato utilizzando il programma SpliceView (<http://www.itb.cnr.it/sun/webgene/>) e l'algoritmo ESEfinder (<http://www.rulai.cshl.edu/tools/ESE>). Il significato funzionale delle variazioni non sinonime è stato predetto utilizzando 4 programmi diversi: PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>), SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT>), SNAP (<http://cubic.bioc.columbia.edu/services/SNAP/submit>) e PMUT (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/pMut/>). L'effetto della variazione osservata nel peptide segnale sul taglio del peptide stesso è stata predetta utilizzando l'algoritmo 3.0

(www.cbs.dtu.dk/services/SignalP). L'analisi di allineamento delle sequenze proteiche umane di PRF1 e TREX1 con le sequenze ortologhe è stato effettuato tramite il programma ClustalW (<http://saier-144-37.ucsd.edu/clustalw>).

Tab.1A Parametri clinici ed immunologici dei pazienti con LES.

Parametro	% di pazienti	
Manifestazioni cliniche:	Eritema malare	43
	Fotosensibilità	43
	Lesioni discoidi	11
	Sierositi*	31
	Artrite	71
	Glomerulonefrite	37
	Anemia emolitica autoimmune	9
	Fenomeno di Raynaud	33
	Linfoadenopatia	13
	Leucopenia e/o linfopenia [§]	53
	Trombocitopenia [#]	23
	Coinvolgimento neurologico [@]	17
	Sindrome da antifosfolipidi	26
Autoanticorpi:	ANA	94
	anti-dsDNA	78
	anti-La (SSB)	6
	anti-Ro (SSA)	38
	anti-RNP e/o Sm	28
	Antifosfolipidi [†]	46
	Fattore Reumatoide	20

ANA = anticorpi antinucleo; anti-dsDNA = anti-double-stranded DNA.

*Comprende pericardite e/o pleurite.

[§]Conta leucocitaria <4,000/mm³; conta linfocitaria <1,500/mm³.

[#]Conta piastrinica <100,000/mm³.

[@]Comprende epilessia e/o psicosi e/o attacco ischemico transiente.

[†]Presenza di anticorpi anti-cardiolipidina e/o di attività lupus anticoagulante.

Tab.1B Parametri clinici ed immunologici dei pazienti con SSc.

Parametro	% di pazienti	
Forma di SSc:	Diffusa	19
	Limitata	81
Manifestazioni cliniche:	Fibrosi	42
	Ipertensione delle arterie polmonari (PAH)*	13
Autoanticorpi:	ACA	41
	anti-topo I	39
	anti-RNAPIII	5

*Definita come pressione sistolica del ventricolo destro ≥ 40 mmHg;

ACA = anticorpi anti-centromero; anti-topo I = anticorpi anti-topoisomerasi I; anti-RNAPIII = anticorpi anti-RNA polimerasi III

RISULTATI

PRF1

L'intera sequenza codificante del gene *PRF1* (cromosoma 10q22.1) è stata analizzata per la ricerca di nuove variazioni, tramite DHPLC e/o sequenziamento diretto, in 154 pazienti affetti da LES, 131 pazienti affetti da SSc e 559 controlli sani. Tutti i pazienti ed i controlli appartengono alla popolazione italiana.

Sono state riscontrate complessivamente 22 variazioni (11 non sinonimie ed 11 sinonime), otto delle quali non sono state mai descritte precedentemente. Quattro di queste ultime sono varianti non sinonime: due (c.985G>A e c.1541A>G) sono state osservate ciascuna in un solo paziente affetto da LES ed in eterozigosi e causano rispettivamente le sostituzioni aminoacidiche Val329Ile e His514Arg; una (c.1000G>A – p.Gly334Ser) è stata trovata due volte, in un paziente affetto da SSc ed in un controllo sano; l'ultima (c.1310C>T, codificante per la sostituzione Ala437Val) è stata riscontrata solo in un controllo. Le altre 4 varianti nuove riscontrate (c.189A>C, c.273G>A, c.807C>T e c.1356C>T) sono sinonime; c.189A>C e c.807C>T sono state osservate solo in pazienti LES (in un solo paziente ciascuna ed in eterozigosi), mentre le varianti C.1356C>T e c.273G>A sono state trovate anche nei controlli (vedi tabella 2).

Oltre alle nuove variazioni, abbiamo osservato anche 14 varianti precedentemente descritte, 7 delle quali non sinonime (c.11G>A, c.272C>T, c.368G>A, c.403G>A, c.695G>A, c.755A>G e c.1262T>C) e 7 sinonime (c.435G>A, c.462A>G, c.519G>A, c.822C>T, c.900T>C c.999C>T e c.1620A>G). L'elenco completo delle variazioni sinonime e non sinonime osservate in *PRF1* è riportato nella tabella 2.

Tra le sostituzioni non sinonime, c.403G>A, responsabile della sostituzione aminoacidica Val135Met è riportata sulle banche dati (rs12263572) con una MAF (minor allele frequency) di 0,0014 nella popolazione AGI-ASP (Caucasoidi e Afro-Americani apparentemente sani). La MAF riportata nelle famiglie CEPH è = 0,00. Nella nostra popolazione è stata osservata in un solo paziente affetto da LES. La variazione c.11G>A – rs35418374 causa il cambiamento aminoacidico Arg4His nel peptide segnale e nella nostra casistica è stata riscontrata solo in un paziente affetto da SSc. Nei database pubblici è riportata con MAF = 0,013 nella popolazione AGI-ASP. Tutte le altre variazioni non sinonime sono state osservate anche nella casistica di controlli. Due di queste (c.272C>T –rs35947132 e c.755A>G –rs28933375) sono polimorfismi del gene *PRF1* per i quali è già stato ipotizzato un ruolo funzionale (vedi discussione) e causano rispettivamente le sostituzioni p.Ala91Val e p.Asn252Ser.

Le variazioni nucleotidiche c.822C>T (rs995821) e c.900T>C (rs995822) sono state precedentemente riportate in letteratura come polimorfismi comuni di PRF1 non associati a patologie. I due polimorfismi non predicono una sostituzione e non coinvolgono siti di splicing, le loro frequenze alleliche non differiscono in modo statisticamente significativo tra controlli ed i pazienti affetti da LES o da SSc e pertanto non sono stati ulteriormente analizzati. Sono inoltre state riscontrate altre due variazioni sinonime (c.435G>A e c.462A>G), già descritte in LD assoluto ($D'=1$, $r^2=1$) con c.755A>G (p.Asn252Ser), che infatti sono state osservate solo nei soggetti portatori di questa variazione. Le due varianti sinonime non sono state considerate nelle analisi successive. Ad eccezione di p.Ala91Val, tutte le altre variazioni sono sempre state osservate in eterozigosi.

Le sostituzioni p.Arg232His, p.Val329Ile e p.Gly334Ser si trovano nel dominio MACPRF. In particolare p.Arg232His cade in una sequenza ad alfa elica anfipatica strutturalmente conservata, compresa tra i residui 212-241, omologa alle componenti C5b e C9 della cascata del complemento (Voskoboinik et al. 2006). Le varianti p.Phe421Cys, p.Ala437Val e p.His514Arg sono situate nella sequenza proteica di omologia con il dominio C2 della proteina chinasi C (PKC). Le altre sostituzioni aminoacidiche non ricadono in domini funzionali di PRF1.

Per predire la rilevanza funzionale delle sostituzioni non sinonime osservate sono stati utilizzati 4 diversi algoritmi: PolyPhen, SIFT: sorting intolerant from tolerant, SNAP e PMUT). Solo la sostituzione p.His514Arg è stata predetta come non tollerata o patologica da tre programmi diversi (tabella 4). I risultati dell'allineamento con sequenze proteiche ortologhe e paraloghe ha dimostrato che l'istidina in posizione 514 è conservata tra le diverse specie (PolyPhen). Inoltre anche gli amminoacidi corrispondenti alle sostituzioni p.Val135Met, p.Arg232His e p.Ala437Val sono conservati tra i mammiferi. Per stabilire la rilevanza funzionale della variante p.Arg4His, localizzata nel peptide segnale, è stato utilizzato il programma Signal P 3.0. La variante non sembra influenzare né la posizione del sito di taglio (calcolata tra i nucleotidi 21 e 22, in accordo con il database SPdp - <http://proline.bic.nus.edu.sg/spdp>), né la probabilità predetta (signal prediction probability), calcolata sulla base della percentuale di variazione del valore di D score (0,21%), come suggerito da Jarjanazi et al (2007).

Per le variazioni sinonime è stata valutata la loro influenza sullo splicing tramite il programma SpliceView che predice l'eventuale predizione o rimozione di siti accettori o donatori di splicing e tramite l'algoritmo ESEfinder che predice l'eventuale introduzione o rimozione di sequenze di interazione con proteine coinvolte nel processo di splicing (ESE Exonic Splicing Enhancer). Inoltre è stato valutato se le sostituzioni nucleotidiche potessero determinare l'utilizzo di codoni più o meno frequenti rispetto a quelli normalmente usati per la codifica dell'amminoacido.

Tra quelle osservate solo nei pazienti, le variazioni sinonime 807C>T e c.999C>T potrebbero influenzare lo splicing attraverso interazioni con varie proteine regolatorie dello splicing: c.807C>T crea un nuovo sito per SRp35 e c.999C>T rimuove un sito di legame già esistente per SRp40. Inoltre c.273G>A crea un nuovo sito di legame per SRp40, c.1620A>G crea una nuova sequenza di interazione per SF2/ASF, mentre c.1356C>T introduce un nuovo sito di legame per due diverse proteine (SF2/ASF e SC35), ma ne rimuove uno già esistente per SRp40. c.1620A>G potrebbe anche introdurre un nuovo sito accettore di splicing (score 0,53). Il dato non è tuttavia significativo a causa del basso numero di campioni.

I parametri clinici dei pazienti affetti da LES e da SSc portatori di sostituzioni non sinonime del gene *PRF1* sono elencati nelle tabelle 3A e 3B. Tre pazienti affetti da SSc su quattro portatori di una variazione non sinonima di *PRF1* (75%) sono positivi per la presenza di anticorpi anti-topoisomerasi I. La frequenza di questo parametro nella nostra popolazione è del 39%. Non sono state rese disponibili informazioni sui dati clinici dei pazienti LES portatori della variante c.985G>A (p.Val329Ile).

La variazione p.Ala 91Val è stata osservata in 21 pazienti affetti da LES (eterozigoti), 21 pazienti con SSc (eterozigoti) e 61 volte in 57 controlli sani (53 eterozigoti e 4 omozigoti; La variante p.Asn252Ser è stata riscontrata in eterozigosi in 6 pazienti affetti da LES, 4 affetti da SSc e tre controlli sani. Le frequenze alleliche della variante p.Asn252Ser misurate nei controlli differiscono in modo statisticamente significativo rispetto a quelle riscontrate sia nella casistica di LES (0.0027 vs. 0.019, $p=0.0045$, OR=7.34, 95%CI=1.64-37.41), che nei pazienti con SSc (0.0027 vs. 0.015, $p=0.027$, OR=5.76, 95%CI=1.09-32.54). Complessivamente la frequenza cumulativa delle variazioni di *PRF1* è superiore sia nei pazienti affetti da LES (0.23) che in quelli con SSc (0.23) rispetto ai controlli sani (0.12), e questa differenza è statisticamente significativa per entrambe le patologie (LES: $p=0.00046$, OR=2.28 95%CI=1.41-3.67; SSc: $p=0.00074$, OR=2.32 95%CI=1.40-3.64). Se si considerano solo le varianti non sinonime le frequenze alleliche continuano a presentare una distribuzione significativamente diversa tra la casistica di controlli (0.062) e le due casistiche di pazienti (LES=0.097; SSc=0.11), nonostante la significatività statistica diminuisca (LES: $p=0.043$ OR=1.63 95%CI=1.01-2.61, SSc: $p=0.0082$ OR=1.89 95%I=1.17-3.05).

Poiché p.Ala91Val e p.Asn252Ser sono le due variazioni di sequenza non sinonime più frequentemente riscontrate a carico del gene *PRF1*, e a causa delle differenze statisticamente significative osservate nella distribuzione delle frequenze alleliche di p.Asn252Ser per entrambe le malattie, abbiamo deciso di estendere l'analisi di questi due polimorfismi in altri 443 casi di LES, 73 pazienti con SSc e 1297 controlli sani. Nella casistica totale (597 LES, 1856 controlli) le

frequenze alleliche del polimorfismo p.Asn252Ser nei LES (0.010) sono significativamente diverse ($p=0.039$ OR=2.35 95%CI=1.04-5.24) da quelle misurate nei controlli sani (0.0043) (tabella 5B). Inoltre abbiamo riscontrato una differenza statisticamente significativa (0.057 vs. 0.093, $p=0.0054$ OR=1.70 95%CI=1.16-2.47) tra controlli (n=1876) e pazienti affetti da SSc (n=204) nelle frequenze alleliche del polimorfismo p.Ala91Val (tabella 5A). La distribuzione dei genotipi nelle varie popolazioni non devia rispetto a quello atteso in base all'equilibrio di Hardy-Weinberg. Complessivamente la variante p.Ala91Val è stata osservata in 73 pazienti affetti da LES (69 eterozigoti e 4 omozigoti), 36 pazienti con SSc (34 eterozigoti e 2 omozigoti) e 204 controlli sani (196 eterozigoti e 8 omozigoti). Il polimorfismo p.Asn252Ser è portato complessivamente da 12 LES, 4 SSc e 16 controlli, sempre in eterozigosi. Uno dei pazienti affetto da LES era eterozigote sia per p.Ala91Val che per p.Asn252Ser. Tramite una reazione di PCR allele specifica appositamente allestita è stato stabilito che gli aminoacidi 91Val e 252Ser sono codificati su due alleli distinti (eterozigosi composta). Sul database delle mutazioni di PRF1 (<http://bioinf.uta.fi/PRF1base/prf1pub>) non è al momento riportato un paziente con questa combinazione genotipica. Le frequenze alleliche delle varianti p.Ala91Val e p.Asn252Ser sono state testate per tutti i parametri clinici e sierologici delle tabelle 1A e 1B. L'unico risultato statisticamente significativo è una leggera diminuzione dell'allele 91Val nei pazienti LES positivi per la presenza di sierositi (cioè che mostrano pleuriti e/o pericarditi) (0.038 vs. 0.082, $p=0.022$, OR=0.45, 95%CI=0.22-0.90). Tuttavia, questa significatività non sopporta la correzione di Bonferroni.

TREX1

L'unico esone codificante del gene TREX1 (lungo 945 bp) è stato analizzato per la ricerca di nuove variazioni su 210 pazienti affetti da LES, 58 affetti da Sindrome di Sjogren e 150 Sclerodermie. Sono state osservate 7 diverse sostituzioni di una singola base, tutte situate all'interno della sequenza codificante.

Due di queste varianti sono non sinonime (c.592G>A e c.694A>G) e causano rispettivamente le variazioni aminoacidiche p.Glu198Lys e p.Met232Val. La numerazione fa riferimento alla sequenza pubblicata sul database del sito del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (NM_022517.17), ATG=1. Entrambe le varianti non sono mai state descritte in letteratura né riportate su banche dati. Le due mutazioni sono state osservate ciascuna una sola volta, in eterozigosi, rispettivamente in un paziente con SS (p.Glu198Lys) e in un individuo affetto dalla forma limitata di SSc (p.Met232Val) (Tabella 6.A).

Le altre 5 variazioni osservate (c.144C>G, c.198G>A, c.462T>C, c.531C>T e c.912G>A) sono sinonime (Tabella 6.B). Solo una di queste (c.144 C>G) è stata osservata per la prima volta in

questo studio, in un paziente affetto da LES. Le altre 4 sono invece già state descritte in letteratura (Lee-Kirsch, et al, 2007) e riportate su banche dati pubbliche. La variante c.912G>A è stata osservata in eterozigosi in due pazienti affetti rispettivamente da SS e da LES. Le variazioni c.198G>A e c.462T>C sono invece state osservate nello stesso paziente, affetto da SS. La variante c.531C>T - rs11797 è un polimorfismo comune del gene TREX1.

Le due mutazioni missense, p.Glu198Lys e p.Met232Val, coinvolgono entrambe un residuo amminoacidico conservato tra le specie (analisi effettuata tramite il programma CLUSTAL W). La variazione p.Glu198Lys colpisce un amminoacido all'interno della sequenza conservata tra le diverse specie Exo3 che costituisce, assieme ad Exo 1 e Exo2, il sito catalitico dell'enzima. La variazione p.Met232Val coinvolge invece un amminoacido che cade nella porzione proteica compresa tra Exo3 ed il dominio trans-membrana TMD/TMH.

Un'analisi in silico effettuata con 4 diversi algoritmi (PolyPhen, SIFT, SNAP e pMUT) predice che entrambe le sostituzioni amminoacidiche di TREX1 p.Glu198Lys e p.Met232Val avranno un effetto dannoso sulla funzionalità della proteina, sia per le diverse caratteristiche chimiche degli amminoacidi della sequenza normale e mutata, sia per la conservazione del residuo amminoacidico normalmente tradotto (tabella 7).

La possibile rilevanza funzionale delle variazioni sinonime è stata valutata utilizzando i programmi SpliceView ed ESEfinder. Nessuna delle variazioni osservate sembra modificare i siti di splicing canonici o introdurre nuovi. Tuttavia la variante c.144C>G introduce nuove sequenze di interazione per le proteine SF2/ASF, SF2/ASF(IgM BRCA1) e SR35; la variazione c.592G>A rimuove siti di interazione già esistenti per SF2/ASF e SF2/ASF(IgM BRCA1) e la variante c.912G>A rimuove un sito di legame per SF2/ASF(IgM BRCA1). Inoltre è stata effettuata un'analisi per valutare se le sostituzioni nucleotidiche potessero determinare l'utilizzo di codoni più o meno frequenti rispetto a quelli normalmente usati per la codifica dell'amminoacido. Le differenze più evidenti riguardano la variazione c.144C>G la cui frequenza passa rispettivamente da 19,8‰ a 6,9‰ e la variazione c.912G>A la cui frequenza passa rispettivamente da 39,6‰ a 7,2‰, facendo ipotizzare un possibile effetto dannoso a carico della velocità di trascrizione della proteina.

Sono stati analizzati, al DHPLC, 200 controlli per verificare l'eventuale presenza delle 2 varianti non sinonime riscontrate nei pazienti. Non abbiamo riscontrato la presenza di tali variazioni in nessun controllo della casistica analizzata. Inoltre anche nelle casistiche di controlli riportati nello studio effettuato da Lee-Kirsch et al, 2007 non risulta la presenza di queste 2 nuove variazioni in oltre 1912 controlli analizzati, suggerendo che non si tratta di polimorfismi rari.

Per le variazioni sinonime, poiché l'analisi in silico non sembrava suggerire evidenti conseguenze funzionali, non abbiamo analizzato controlli della nostra popolazione ma ci siamo limitati al

confronto con la letteratura (tabella 6B). Per le varianti c.144C>G, c.198G>A e c.462T>C non risultano differenze significative tra le frequenze alleliche e genotipiche riscontrate nei nostri pazienti e quelle riportate in letteratura per la popolazione sana. Per la variazione c.912G>A si osserva però una differenza significativa tra la frequenza osservata su controlli sani da Lee-Kirsch, et al, 2007 (2%) e quella riscontrata nel nostro studio (0.2%) ($p = 0.003$).

Abbiamo inoltre valutato la distribuzione delle frequenze alleliche e genotipiche del polimorfismo comune rs11797 in rapporto alla presenza/assenza di caratteristiche cliniche e sierologiche riportate nelle tabelle 1A e 1B, nei pazienti affetti da LES e da SSc. Infatti, in un precedente studio, condotto sulla popolazione coreana, (Hur et al, 2007) l'allele T di questo polimorfismo è risultato associato con la negatività agli autoanticorpi anti-dsDNA. Dalla nostra analisi invece si osserva una associazione statisticamente significativa tra il genotipo TT e la positività per gli anticorpi anti-dsDNA nei pazienti affetti da LES ($p = 0.009$ tabella 8). Questo diverso risultato può essere causato dalle differenze genetiche tra la popolazione europea e quella coreana. Per le altre caratteristiche analizzate non si osserva nessuna differenza statisticamente significativa tra le frequenze alleliche e genotipiche osservate per nessuna delle caratteristiche cliniche e sierologiche valutate ($p > 0,10$).

Tab.2 Riassunto delle variazioni di *PRF1* osservate nel primo pannello di pazienti (LES e SSc) e controlli.

Variazione nucleotidica	Cambiamento aminoacidico	esone	ID*	Segnalazioni precedenti [§]	SLE [#]	SSc [#]	controlli [#]
c.11G>A	Arg4His	2	rs35418374	AA, SoJIA, controlli	0/154	1/131	0/559
c.189A>C	Thr63Thr	2		nuova	1/154	0/131	0/559
c.272C>T	Ala91Val	2	rs35947132	FHL2, controlli	21/154	21/131	57/559
c.273G>A	Ala91Ala ¹	2		nuova	1/154	1/131	1/559
c.368G>A	Arg123His ²	2		ALCL, controlli	0/154	1/131	1/559
c.403G>A	Val135Met	2	rs12263572	Database SNP	1/154	0/131	0/559
c.435G>A	Val145Val	2		Database SNP	6/154	4/131	3/559
c.462A>G	Ala154Ala	2		Database SNP	6/154	4/131	3/559
c.519G>A	Thr173Thr ³	2		controlli	1/154	1/131	1/559
c.695G>A	Arg232His ⁴	3		FHL2, ALCL, familiari sani	0/154	0/131	1/559
c.755A>G	Asn252Ser	3	rs28933375	FHL2, controlli	6/154	4/131	3/559
c.807C>T	His269His	3		nuova	1/154	0/131	0/559
c.822C>T	Ala274Ala	3	rs885821	Database SNP	54/163	48/136	258/772
c.900T>C	His300His	3	rs885822	Database SNP	110/162	92/136	562/771
c.985G>A	Val329Ile	3		nuova	1/154	0/131	0/559
c.999C>T	Pro333Pro	3		SM	0/154	1/131	0/559
c.1000G>A	Gly334Ser	3		nuova	0/154	1/131	1/559
c.1262T>C	Phe421Cys	3		FHL2, ALCL	0/154	1/131	1/559
c.1310C>T	Ala437Val	3		nuova	0/154	0/131	1/559
c.1356C>T	Thr452Thr	3		nuova	1/154	0/131	1/559
c.1541A>G	His514Arg	3		nuova	1/154	0/131	0/559
c.1620A>G	Gln540Gln	3		SM	1/154	0/131	1/559

La numerazione fa riferimento al clone cDNA di GeneBank M28393, ATG = +1.

Ad eccezione di p.Ala91Val, tutte le altre variazioni sono state osservate in eterozigosi.

* Numero di identificazione riportato sul database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

[§]FHL2 = Linfocitocitosi Emofagocitica Familiare; ALCL = Linfoma Anaplastico a Grandi Cellule; SoJIA = Systemic onset Juvenile Idiopathic Arthritis; SM = Sclerosi Multipla; AA = Anemia Aplastica.

[#] numero di individui in cui è stata osservata la variazione sul totale dei soggetti analizzati per singole casistiche (LES, SSc e controlli)

¹ Il controllo sano è eterozigote anche per il polimorfismo p.Ala91Val.

² Sia il paziente SSc che il controllo sano portatori della variante p.Arg123His sono eterozigosi anche per la variazione sinonima c.519G>A.

³ Sia il paziente SSc che il controllo sano sono eterozigoti anche per la sostituzione non sinonima p.Arg123His

⁴ Il controllo è portatore anche di 91Val sullo stesso allele di 232His, come è stato stabilito tramite PCR allele-specifica.

Tab. 3 Caratteristiche cliniche ed immunologiche dei pazienti con LES (A) e SSc (B) che riportano varianti rare di PRF1.

A

Genotipo PRF1	sexo	MR	PS	S	Ar	GNF	AHA	LA	Lp/Lp	TP	NI	aPL	ANA	aDNA	SSA	LAC	RF
V135M/wt	F	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
H514R/wt	F	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-

MR = malar rash; PS = fotosensibilità; LED = lesioni discoidi; S = sierositi; A = artrite; GNF = glomerulonefrite; LA= linfadenopatia; AHA = anemia emolitica autoimmune; Lp/Lp = leucopenia e/o linfopenia; TP = trombocitopenia; NI = coinvolgimento neurologico; aPL = sindrome da antifosfolipidi; ANA= anticorpi antinucleo; aDNA= anticorpi anti-dsDNA; SSA = anticorpi antiRo (SSA); LAC = presenzadi attività lupus anticoagulante; RF = fattore reumatoide.

Entrambi i pazienti in questa tabella sono negativi per la presenza di lesioni discoidi e di anticorpi anti-RNP e/o Sm. Le informazioni cliniche riguardanti la presenza di ulcere orali, fenomeno di Raynaud e anticorpi anti-La (SSB) non erano disponibili. Le informazioni cliniche relative ai pazienti che riportano la variante c.985G>A (p.Val329Ile) non erano disponibili.

B

Genotipo PRF1	sexo	età alla diagnosi	diagnosi	fibrosi polmonare	PAH	ACA	anti-topo I	anti-RNAPIII
R123H/T173T	F	50	ISSc	n.a	-	-	-	+
F421C/wt	M	39	dSSc	-	n.a	-	+	-
G334S/wt	F	12	SSc early	-	-	-	+	-
R4H/wt	F	56	ISSc	-	+	-	+	-

ISSc = forma limitata; dSSc = forma diffusa; SSc early = forma precoce della malattia, che non soddisfa tutti i criteri; SSc ss = sine scleroderma (è considerata una forma limitata, non si ha coinvolgimento cutaneo); PAH = ipertensione delle arterie polmonari; ACA= anticorpi anti-centromero; anti-topo I = anticorpi anti-topoisomerasi I; anti-RNAPIII = anticorpi anti-RNA polimerasi III; n.a. = informazione clinica non disponibile.

Tab.4 Predizione in silico dell'effetto delle variazioni missense di *PRFI* sulla struttura e sulla funzione della proteina effettuata utilizzando quattro programmi: Polyphen, SIFT, SNAP, e PMUT.

Cambiamento aminoacidico	Polyphen		SIFT		SNAP		PMUT	
	predizione	score ^a	predizione	score ^b	predizione	Precisione attesa ^c	predizione	score ^d
Arg4His	benigna	none	-	-	neutrale	60%	neutrale	0,2352
Arg123His	benigna	0,103	non tollerata	0,03	non neutrale	78%	neutrale	0,3133
Val135Met	benigna	1,380	non tollerata	0,02	non neutrale	82%	neutrale	0,2700
Arg232His	benigna	0,012	non tollerata	0,02	neutrale	69%	patologica	0,5239
Val329Ile	benigna	0,148	tollerata	0,44	neutrale	78%	neutrale	0,0468
Gly334Ser	benigna	1,378	tollerata	0,74	neutrale	92%	neutrale	0,3109
Phe421Cys	benigna	0,078	tollerata	0,07	non neutrale	63%	patologica	0,8781
Ala437Val	benigna	1,487	non tollerata	0,02	non neutrale	78%	neutrale	0,4791
His514Arg	possibile danno	1,518	non tollerata	0,00	neutrale	53%	patologica	0,7938

^a = minore è il punteggio più benigna sarà la sostituzione (PolyPhen)

^b = maggiore è il punteggio più il cambiamento sarà tollerato (SIFT)

^c = maggiore è la percentuale maggiore sarà l'affidabilità della previsione (SNAP)

^d = minore sarà il punteggio più la sostituzione sarà considerata neutrale (pMUT)

Tab.5 Frequenze alleliche e genotipiche delle varianti p.Ala91Val (A) e p.Asn252Ser (B) nei pazienti e nei controlli.

A		CONTROLLI n=1856	LES n=597			SSc n=204		
genotipo	n(frequenza)	n(frequenza)	p	OR (95%CI)	n(frequenza)	p	OR (95%CI)	
CC	1652 (0.890)	524 (0.877)	0.45	0.89 (0.66-1.19)	168 (0.823)	0.0070	0.58 (0.38-0.87)	
CT	196 (0.106)	69 (0.116)	0.52	1.11 (0.81-1.49)	34 (0.167)	0.012	1.69 (1.12-2.56)	
TT	8 (0.004)	4 (0.007)	0.50	1.56 (0.39-5.71)	2 (0.010)	0.26	2.29 (inaccurato)	
allele	frequenza	frequenza	p	OR (95%CI)	frequenza	p	OR (95%CI)	
C	0.943	0.936			0.907			
T	0.057	0.064	0.38	1.14 (0.86-1.50)	0.093	0.0054	1.70 (1.16-2.47)	

B		CONTROLLI n=1856	LES n=597			SSc n=204		
genotipo	n(frequenza)	n(frequenza)	p	OR (95%CI)	n(frequenza)	p	OR (95%CI)	
AA	1840 (0.991)	585 (0.980)	0.038	0.42 (0.19-0.96)	200 (0.980)	0.13	0.43 (0.13-1.55)	
AG	16 (0.009)	12 (0.020)	0.038	2.36 (1.04-5.30)	4 (0.020)	0.13	2.30 (0.64-7.41)	
GG	0	0			0			
allele	frequenza	frequenza	p	OR (95%CI)	frequenza	p	OR (95%CI)	
A	0.996	0.990			0.990			
G	0.004	0.010	0.039	2.35 (1.04-5.24)	0.010	0.13	2.29 (0.64-7.32)	

La distribuzione complessiva delle frequenze genotipiche della variante p.Ala91Val è significativamente diversa tra controlli e casi di SSc (p=0.017), ma non tra controlli e LES (p=0.60).

Gli OR significativi sono evidenziati in grassetto.

Tabella 6A: mutazioni non-sinonime trovate nell'esone codificante di *TREX1*

Variazione nucleotidica ^a	cambiamento aminoacidico	ID	LES ^b	SSc ^b	SS ^b	controlli
c.592G>A	Glu198Lys	nuova	0/210)	0/150	1/58	0/200
c.694A>G	Met232Val	nuova	0/210)	1/150	0/58	0/200

MAF: (minor allele frequency): frequenza dell'allele minore;

^a: la numerazione è relativa al nucleotide A (1) del primo codone tradotto ATG del trascritto NM_022517.17; le variazioni trovate risultano essere tutte in eterozigosi;

^b numero di individui in cui è stata osservata la variazione sul totale dei soggetti analizzati per singole casistiche (LES, SSc, SS e controlli)

Tabella 6B: variazioni sinonime trovate nell'esone codificante di *TREX1*

Variazione nucleotidica ^a	cambiamento aminoacidico	ID, referenza	LES ^b	SSc ^b	SS ^b	Controlli letteratura ^c (Lee-Kirsch 2007)	MAF ^d
c.144C>G	Pro48Pro	nostro studio	1/210	0/150	0/58	0,000	0,001
c198G>A*	Lys66Lys	rs3135943 Lee-Kirsch 2007	0/210	0/150	1/58	0,003	0,001
c.462T>C*	Asp154Asp	rs3135944 Lee-Kirsch 2007	0/210	0/150	1/58	0,003	0,001
c.531C>T	Tyr177Tyr	rs11797 Lee-Kirsch 2007	110/210	75/150	29/58	0,425	0,383
c.912G>A	Leu304Leu	rs3135945 Lee-Kirsch 2007	1/210	0/150	1/58	0,019	0,002

MAF: (minor allele frequency): frequenza dell'allele minore;

^a: la numerazione è relativa al nucleotide A (1) del primo codone tradotto ATG del trascritto NM_022517.17; le variazioni trovate risultano essere tutte in eterozigosi;

^b numero di individui in cui è stata osservata la variazione sul totale dei pazienti analizzati per singole patologie (LES, SSc e SS)

^c: le frequenze dell'allele minore riportate in letteratura, sono state calcolate sulla casistica che comprende sia i controlli (N:1712) che i pazienti (N:586). Gli autori riportano che i dati risultano equamente distribuiti tra pazienti e controlli

^d gruppo di individui analizzati di nazionalità caucasioide (NCBI database SNP)

*Le 2 varianti sono state osservate nello stesso paziente (SS).

Tabella 7: risultati dell'analisi in silico effettuata con l'utilizzo dei programmi PolyPhen, SIFT, SNAP e pMUT per le mutazioni non-sinonime Glu198Lys e Met232Val

Variazione	PolyPhen		SIFT		SNAP		pMUT	
	predizione	score ^a	predizione e	score ^b	predizione	Precisione attesa ^c	predizione	score ^c
Glu198Lys	Possibile danno	1.61	Non tollerato	0.00	Patologica	82%	non-neutrale	0.54
Met232Val	Probabile danno	2.27	Non tollerato	0.00	Patologica	78%	non-neutrale	0.58

^a = minore è il punteggio più benigna sarà la sostituzione (PolyPhen)

^b = maggiore è il punteggio più il cambiamento sarà tollerato (SIFT)

^c = maggiore è la percentuale maggiore sarà l'affidabilità della previsione (SNAP)

^d = minore sarà il punteggio più la sostituzione sarà considerata neutrale (pMUT)

Tabella8: associazione tra le frequenze genotipiche e alleliche del polimorfismo rs11797 (c.531C>T) e la presenza/assenza degli anticorpi ANTI-dsDNA nei pazienti affetti da LES

Polimorfismo Tyr177Tyr in TREX1 associato agli Ab ANTI-DNA			
GENOTIPO	ANTICORPI ANTI-DNA		ASSOCIAZIONE GENOTIPO E Ab ANTI-DNA p OR (95% CI)
	POSITIVI	NEGATIVI	
CC	54 (35%)	11 (34%)	p=0.90 OR= 1.03 (0.509-2.08)
CT	74 (48%)	21 (66%)	p=0.106 OR= 0.48 (0.20-1.14)
TT	26 (17%)	0 (0%)	p=0.0093007 OR= 6.50 (0.88-133.40)
ALLELE: T	0.41	0.33	p = 0.29 OR= 1.42 (0.78-2.61)

DISCUSSIONE

In questo studio ci siamo posti lo scopo di investigare il ruolo di varianti rare di due geni; *PRF1* e *TREX1* nel determinare suscettibilità a tre diverse malattie autoimmuni: LES, SSc e SS (per quest'ultima è stato per il momento analizzato solo il gene *TREX1*).

Le due varianti non sinonime più frequenti del gene *PRF1* sono p.Ala91Val e p.Asn252Ser. Entrambe queste variazioni sono state precedentemente osservate in associazione con altre malattie autoimmuni, in particolare con ALPS e T1D (p.Asn252Ser), DALD e MS (p.Ala91Val). In questo lavoro osserviamo un'associazione con le frequenze alleliche di *PRF1* anche nel LES (p.Asn252Ser) e con la SSc (p.Ala91Val), (anche se ammettiamo che quest'ultimo dato potrebbe essere inficiato dalla bassa numerosità campionaria, dovuta alla rarità della malattia). Studi basati su modelli sia umani (analisi dei linfociti citotossici su soggetti portatori dell'allele 91Val), che murini (cellule basofile leucemiche di ratto trasfettate con cDNA di *PRF1* contenenti la variazione) hanno evidenziato una rilevanza funzionale per la sostituzione p.Ala91Val, che causa un cambiamento conformazionale che a sua volta genera una diminuzione della stabilità della proteina e dell'attività NK (circa il 50% dell'attività della PRF1 wild-type) (Trambas et al. 2005, Voskoboinik et al. 2005, Risma et al. 2006). Il significato funzionale di p.Asn252Ser è invece incerto. La variazione è localizzata nel membrane attack complex, un dominio critico per la funzione di PRF1 di formazione di pori nella membrana cellulare. Tuttavia più di un lavoro ha associato questa variante con livelli normali di espressione di PRF1 ed una normale attività NK (Stepp et al. 1999, Voskoboinik et al. 2005, Risma et al. 2006). Al contrario sono stati recentemente descritti due pazienti pediatrici, uno con ALPS e l'altro con T1D eterozigoti per la variante p.Asn252Ser che presentavano bassi livelli di attività NK nella prima infanzia (Clementi et al. 2006; Orilieri et al. 2008). Nel paziente con ALPS l'attività NK è revertita a livelli fisiologici intorno ai 12 anni di età (Clementi et al. 2006). Perciò è possibile che la variazione p.Asn252Ser, o un'altra variante associata ad essa, causi una diminuzione della funzione NK durante la prima infanzia, ma che successivamente questa venga normalizzata da un meccanismo compensatorio. Non sembra molto probabile che questo meccanismo ipotetico sia coinvolto nella suscettibilità a patologie come il LES o la SSc, che solitamente hanno esordio nell'età adulta, tuttavia è stato descritto anche un paziente adulto omozigote per l'allele 252Ser e con bassa attività NK (Orilieri et al. 2008). E' noto che p.Asn252Ser è in LD assoluto ($D'=1$, $r^2=1$) con due varianti sinonime (c.435G>A e c.462A>G) e la stessa osservazione è stata confermata anche nella nostra casistica. E' possibile che queste, oppure altre variazioni ignote, situate nelle regioni regolatorie di PRF1 da noi non analizzate ed in LD

assoluto con p.Asn252Ser possano avere un effetto sulla funzione proteica. Entrambe le variazioni c.435G>A e c.462A>G cambiano un codone comune con uno più raro, ed è stato osservato che questo fatto può portare ad anomalie nel folding della proteina (Komar 2007).

Oltre a p.Ala91Val e p.Asn252Ser sono state riscontrate altre 9 variazioni non sinonime. A parte p.Ala91Val e p.Asn252Ser, le altre varianti analizzate sono molto rare, per cui non è possibile effettuare una valutazione su base statistica della loro eventuale associazione individuale con le due malattie, ma, analogamente a quanto già osservato nella SM (Cappellano et al. 2008), l'incidenza complessiva di variazioni di sequenza non sinonime nel gene *PRF1* è più elevata nei pazienti rispetto ai controlli sia per la casistica di LES (p=0.043, OR = 1.63) che per quella di SSc (p=0.0082 OR = 1.89).

La variazione p.Arg4His è localizzata nel peptide segnale. Nella nostra popolazione è stata riscontrata in un paziente affetto da SSc limitata con ipertensione delle arterie polmonari. Precedentemente era già stata segnalata in eterozigosi in un paziente Afro-Americano di 21 anni affetto da anemia aplastica (Solomou et al. 2007), in un soggetto Europeo con SoJIA (Systemic onset Juvenile Idiopathic Arthritis) (Vastert et al. 2008), ma anche in 21/1156 controlli sani (frequenza allelica = 0,009) (Solomou et al. 2007). Inoltre è stato riportato con una MAF simile anche nelle banche dati (popolazione AGI-ASP). La perforina è secreta in forma inattiva, ed attivata tramite taglio proteolitico. Sulla base dell'analisi in silico, questa variazione non sembra influenzare il taglio proteolitico del peptide segnale o il trasporto della proteina stessa. Considerando i dati in nostro possesso, questa variazione sembra un polimorfismo che probabilmente non influenza negativamente l'attività della proteina.

Altre tre variazioni sono state osservate ciascuna in un singolo paziente con LES. Una di queste (p.Val135Met) è riportata sulle banche dati come rs12263572, ed era stata identificata sulla popolazione AGI-ASP (Caucasoidi e Afro-Americani apparentemente sani), ma non è mai stata descritta in letteratura, le altre (p.His514Arg e p.Val329Ile) sono variazioni nuove. Le sostituzioni p.Val135Met e p.His514Arg compromettono residui conservati situati all'interno di regioni funzionalmente importanti (rispettivamente il dominio MACPRF ed il dominio C2), e p.His514Arg è stata predetta come non neutrale da tre diversi algoritmi (tabella 4). La variazione p.Val329Ile è una sostituzione conservativa, che ricade nel dominio MACPRF ma non coinvolge un residuo conservato, ed è stata predetta come sostituzione neutrale da tutti i programmi utilizzati per l'analisi, pertanto la consideriamo un polimorfismo che probabilmente non influenza la funzione di PRF1.

Abbiamo osservato altre 5 variazioni non sinonime, ma tutte quante sono state riscontrate anche nella casistica di controlli. Tre di queste (p.Arg123His, p.Gly334Ser e p.Phe421Cys) sono state

osservate ciascuna in un caso di SSc ed in un controllo sano, due (p.Arg232His and p.Ala437Val) ciascuna in un singolo soggetto di controllo. Tra le variazioni riscontrate nella casistica di SSc, p.Phe421Cys è localizzata nel dominio C2, responsabile del legame di PRF1 con la membrana plasmatica. Era stata precedentemente descritta in eterozigosi in un paziente pediatrico Italiano con linfoma anaplastico a grandi cellule (ALCL) (Cannella et al.2007) ed in eterozigosi composta con p.Ala91Val in un paziente caucasioide di FHL2 (Clementi et al. 2005). In entrambi i soggetti la variazione p.Phe421Cys è stata riscontrata a carico della linea germinale. Nella nostra casistica è stata trovata due volte, in un paziente con SSc diffusa ed in un controllo sano. Complessivamente, considerando le informazioni presenti in letteratura ed i dati ricavati dall'analisi in silico, il significato funzionale di questa sostituzione non è chiaro. Al contrario la variazione p.Arg123His non ricade in un dominio funzionale o in una posizione conservata. Era stata precedentemente descritta in eterozigosi in un paziente di 14 anni affetto da ALCL (Cannella et al.2007), ed in 1/101 controlli sani, eterozigote anche per la variazione sinonima c.519G>A (Molleran Lee et al. 2004). E' considerata da molti autori un polimorfismo di *PRF1*. Nella nostra popolazione è stata osservata due volte, in un controllo sano ed in un paziente affetto da SSc limitata, entrambi portatori anche della variazione c.519G>A. Viene considerata neutrale dagli algoritmi Polyphen e PMUT. Complessivamente non pensiamo che questa variazione possa avere un effetto patologico sulla funzione proteica. La terza variazione, p.Gly334Ser, localizzata nel dominio MACPRF, non è mai stata descritta precedentemente. Coinvolge un residuo non conservato ed è considerata neutrale dai quattro algoritmi utilizzati per l'analisi, per cui sembra improbabile che possa avere un effetto sulla funzione della proteina.

La sostituzione p.Arg232His è stata riscontrata nello stesso allele con p.Ala 91Val in un controllo sano. E' stata precedentemente descritta e registrata sull' Human Gene Mutation Database – HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index>) da Feldmann et al. (2002) in eterozigosi in due pazienti consanguinei con FHL2 ad esordio tardivo appartenenti alla popolazione italiana, e nella loro madre (sana). In questi pazienti gli autori hanno riscontrato circa il 27% dell'attività citotossica e livelli di espressione di PRF1 non rilevabili. In nessuno dei due è stata ritrovata la mutazione sul secondo allele. Uno dei pazienti era ancora in vita all'età di 14 anni senza aver avuto bisogno di ricevere un trapianto di midollo. Busiello et al. (2004) hanno trovato la variante p.Arg232His in due gemelli di 13 anni, uno dei quali affetto da FHL, mentre l'altro era sano. Entrambi i gemelli erano omozigoti per la variante p.Ala91Val ed eterozigoti per p.Arg232His (uno degli alleli era “doppiamente mutato”). La variazione Arg232His era presente anche nel padre sano. Questa variazione è stata riscontrata anche in un altro paziente Italiano con FHL ad esordio tardivo, in eterozigosi composta con una mutazione missense (p.His222Gln) (Stadt et al. 2006). In uno studio condotto su un'ampia

coorte Trizzino et al. (2008) hanno riscontrato questa variazione in quattro famiglie con membri affetti da FHL2, tre dei quali erano Italiani, e il quarto proveniva dalla Germania ma era di probabili origini italiane. La variazione è stata inoltre osservata in un paziente pediatrico italiano con ALCL, in eterozigosi composta con p.Ala91Val (Cannella et al. 2007). Voskoboinik et al (2005) hanno effettuato un'analisi funzionale della PRF1 Arg232His-mutata e Arg232His/Ala91Val-doppiamente mutata. La perforina Arg232His-mutata genera approssimativamente il 30% dell'attività NK rispetto alla proteina nativa, mentre la forma doppiamente mutata è completamente inattiva. Risma et al. (2006) hanno analizzato funzionalmente 21 mutazioni missense di *PRF1* tramite citofluorimetria, immunoistochimica ed immunoblotting, ed hanno dimostrato che la PRF1 con la sostituzione Arg232His è soggetta a maturazione proteolitica parziale. Complessivamente i dati disponibili in letteratura mostrano chiaramente che la sostituzione p.Arg232His compromette parzialmente l'attività citotossica di PRF1. Tuttavia la penetranza di questa variazione sembra essere incompleta. Infatti individui con lo stesso pattern di variazioni presentano condizioni patologiche diverse, ed alcuni di essi sono sani. Queste osservazioni sono simili a quelle riportate per la variante p.Ala91Val, che molti autori considerano un polimorfismo di *PRF1*. Inoltre l'elevato numero di segnalazioni di p.Arg232His suggerisce che si tratti di una variante relativamente comune nella popolazione italiana, per cui non deve stupire il fatto di averla riscontrata in un controllo sano, in *cis* con la variazione comune p.Ala91Val. Sulla base dei dati di Voskoboinik et al (2005) potremmo speculare che questo soggetto abbia probabilmente il 50% dell'attività citotossica, sufficiente ad evitare lo sviluppo di FHL2. Purtroppo non è stato possibile effettuare un ulteriore follow up successivo al reclutamento di questo soggetto, per cui non possiamo sapere se esso abbia in seguito sviluppato un linfoma. L'ultima variazione (p.Ala 437Val) è stata osservata in un solo controllo, e non è mai stata segnalata prima. Nonostante codifichi per una sostituzione conservativa tra due aminoacidi non polari, è considerata non tollerata da due diversi algoritmi predittivi, ed è situata in una posizione conservata nel dominio C2, per cui sarebbe troppo semplicistico considerarla una variante neutrale. E' possibile che, così come p.Ala91Val e p.Arg232His, anche la variazione p.Ala437Val abbia un qualche effetto funzionale con bassa penetranza, ma sarebbero necessari ulteriori studi per chiarire questo punto.

Durante lo screening mutazionale di *PRF1* abbiamo identificato anche 11 variazioni sinonime, comprendenti due polimorfismi comuni (rs885821 e rs885822) e le due varianti in LD assoluto con p.Asn252Ser già menzionate. Tra le rimanenti 7 variazioni, solo 3 erano state precedentemente citate in letteratura, mentre le altre sono nuove. Tutte le variazioni sinonime sono state analizzate in silico per predire la loro influenza sui siti di splicing, sulle sequenze ESE e sulla frequenza relativa di utilizzo del codone che introducono. c.1620A>G e c.999C>T erano state precedentemente

riportate in un paziente affetto da MS ciascuna (Cappellano et al, 2008), rispettivamente in omozigosi ed in eterozigosi. E' stato ipotizzato che c.1620A>G possa influenzare lo splicing, in quanto potrebbe creare un nuovo sito accettore di splicing. Inoltre, in base ai punteggi calcolati con la matrice ESEfinder, sia c.999C>T che c.1620A>G potrebbero influenzare la processazione del messaggero perché rimuovono (c.999C>T) o creano (c.1620A>G) una sequenza ESE. Abbiamo riscontrato la variazione c.519G>A tre volte, una in ciascun gruppo di campioni (LES, SSc, controlli). Il controllo sano ed il paziente con SSc erano anche eterozigoti per la sostituzione p.Arg123His. Come già menzionato precedentemente, c.519G>A è già stata descritta in letteratura unita a p.Arg123His nello stesso controllo sano, ed è stata considerata dagli autori come un polimorfismo. Pertanto riteniamo che si tratti di una variazione silente, relativamente comune nella popolazione italiana, probabilmente in LD con p.Arg123His.

E' più difficile speculare sulla possibile rilevanza funzionale delle variazioni sinonime che vengono qui descritte per la prima volta. Nessuna di esse coinvolge un sito di splicing canonico, tuttavia, in base alle predizioni in silico effettuate con i programmi ESE finder e Splice View, alcune di esse (c.273G>A, c.807C>T, c.1356C>T) potrebbero influenzare lo splicing introducendo o rimuovendo una sequenza di legame per vari fattori di splicing. Le altre varianti osservate non sembrano influenzare lo splicing e non introducono codoni poco usati, per cui sono probabilmente neutre. E' possibile tuttavia che le variazioni osservate non abbiano alcun effetto funzionale diretto, ma che siano in LD con altre variazioni ignote situate nella porzione 5'UTR o nelle sequenze regolatorie a monte ed a valle del gene.

PRF1 potrebbe influire sulla suscettibilità all'autoimmunità attraverso due meccanismi. Da un lato difetti nell'attività della perforina potrebbero causare una insufficiente clearance virale, che potrebbe favorire lo sviluppo di reazioni crociate tra antigeni virali ed antigeni self attraverso il mimetismo molecolare. Dall'altro PRF1 potrebbe essere coinvolta nella modulazione della risposta immune inducendo l'apoptosi in linfociti effettori e cellule presentanti l'antigene. Un suo deficit potrebbe causare un accumulo di linfociti e possibili reazioni autoimmuni.

La scelta di studiare il gene *TREX1* sulle malattie autoimmuni è stata motivata da uno studio del 2007 (Lee-Kirsh) che identificava mutazioni in *TREX1* in 9 su 417 pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico (LES) e 1 su 169 pazienti affetti da Sindrome di Sjogren. Lo studio di Lee-Kirsh suggeriva fortemente un ruolo di *TREX1* nella patogenesi di malattie autoimmuni ma dopo questo lavoro nessun altro studio di conferma è stato pubblicato.

Nel nostro studio sono stati analizzati 210 pazienti affetti da LES, 58 affetti dalla Sindrome di Sjogren e 150 affetti dalla Sclerosi sistemica, alla ricerca di nuove mutazioni all'interno della sequenza codificante e della regione 3' UTR del gene *TREX1*.

In questa analisi abbiamo riscontrato la presenza di 7 sostituzioni di una singola base che ricadono tutte all'interno dell'unico esone codificante di *TREX1*. Due di queste (c.592G>A e c.694A>G) sono variazioni missense mai descritte in precedenza, che causano rispettivamente le variazioni aminoacidiche p.Glu198Lys (riscontrata in eterozigosi in 1 paziente affetto da Sindrome di Sjogren) e p.Met232Val (osservata in eterozigosi un paziente affetto dalla forma limitata di Sclerosi Sistemica). Queste due mutazioni coinvolgono entrambe un dominio altamente conservato tra le diverse specie, e in base ad una predizione in silico effettuata con 4 diversi programmi, entrambe sono ritenute possibilmente dannose da tutti e 4 gli algoritmi utilizzati. Inoltre la variazione Glu198Lys è localizzata all'interno di uno dei tre domini che costituiscono il sito catalitico dell'enzima, il dominio Exo3. Questi tre domini (Exo1, Exo2, Exo3) sono anche conservati tra le diverse specie.

Sono state riportate mutazioni a carico del dominio Exo3 in pazienti affetti da AGS. Per tre di esse è stata caratterizzata la funzione della proteina mutata. Tra queste la sostituzione p.Val201Asp e la mutazione frameshift p.Asp201ins causano in vitro una riduzione dell'attività esonucleasica (Udesh de Silva et al, 2007). L'analisi in silico da noi effettuata predice che questa mutazione abbia un effetto dannoso sulla proteina. Sulla base di questi dati si può presupporre che la mutazione possa diminuire l'attività esonucleasica. Tuttavia, contrariamente a questa ipotesi, studi in vitro hanno dimostrato che un'altra mutazione (p.Asp200Asn), sempre riscontrata nell'AGS, benché cada nel dominio Exo3 non porta ad una riduzione dell'attività catalitica, ma secondo gli autori potrebbe influenzare l'interazione proteina-proteina (Kavanagh et al, 2008). Inoltre dell'analisi in silico effettuata tramite ESEfinder risulta che la variazione introduce tre nuovi siti di legame per i fattori SF2/ASF e SF2/ASF (IgM BRCA 1), pertanto potrebbe anche avere una influenza sullo splicing.

La variazione Met232Val cade nella porzione proteica compresa tra Exo3 ed il dominio transmembrana TMD/TMH. La metionina in posizione 232 è un aminoacido altamente conservato tra le diverse specie. Anche questa mutazione è risultata probabilmente dannosa dalla predizione in silico. La porzione proteica in cui ricade la mutazione Met232Val presenta un'elevata densità di mutazioni precedentemente osservate in altre malattie come la RVLC (Richards et al, 2007) o il LES (Lee-Kirsch et al, 2007). Per alcune di queste è stata eseguita un'analisi funzionale tramite microscopia confocale, ed è stata osservata una non corretta distribuzione intracellulare della proteina, che perde la sua localizzazione perinucleare e si trova diffusa nella cellula. Di conseguenza, si può ipotizzare che la variazione Met232Val causi una alterazione della localizzazione intracellulare di TREX1.

Le due mutazioni missense non sono state osservate né in 200 controlli italiani da noi analizzati né in 1712 controlli sani precedentemente analizzati da Lee-Kirsch et al, e non compaiono nel database degli SNP. Questi dati insieme ai risultati delle analisi in silico qui sopra commentate suggeriscono fortemente che queste variazioni siano associate alla patogenesi delle due malattie (SS e SSc), confermando così il ruolo già precedentemente ipotizzato di *TREX1* nella SS, mentre la sua possibile associazione con la SSc è un dato nuovo. Al contrario non abbiamo riscontrato nessuna variazione missense nei 210 LES esaminati. Questo dato è significativamente diverso ($p = 0.034$) da quanto osservato da Lee-Kirsch et al. 2007 che identificava 9 mutazioni non-sinonime su 417 pazienti affetti da LES, però la significatività può essere dovuta al caso o a caratteristiche genetiche differenti tra nord-europei e popolazione italiana.

Le altre 5 variazioni riscontrate sono tutte sinonime. Una di queste viene qui descritta per la prima volta. Altre tre erano già state tutte osservate da Lee-Kirsch et al, 2007 in pazienti affetti da LES e in individui sani di controllo con una frequenza simile. Inoltre confermiamo la presenza di un polimorfismo comune (rs11797). La variante c.912G>A è stata osservata due volte, entrambe in eterozigosi, in due pazienti affetti rispettivamente da SS e da LES. E' stata precedentemente osservata anche da Lee-Kirsch et al, 2007 con una frequenza pari a circa il 2% su 586 pazienti (417 pazienti affetti da LES e 169 pazienti affetti da SS) e 1712 controlli di nazionalità Europea. Nella nostra casistica di pazienti questo polimorfismo è riscontrato con una frequenza significativamente inferiore (0.2%, $p = 0.003$). La differenza tra le due frequenze è probabilmente dovuta alle diverse caratteristiche genetiche tra individui nord-europei e la popolazione italiana o alla diversità campionaria. Non possiamo però escludere completamente a priori un suo ruolo sulla funzionalità proteica. Infatti, in base alla predizione effettuata con il programma ESEfinder, possiamo ipotizzare che tale variazione causi la scomparsa di una sequenza di legame per il fattore di splicing ricco in serine e arginine SF2/ASF (IgM BRCA1). Inoltre si osserva come la sostituzione di una G con una A a carico del codone 912 porti la sostituzione di un codone comune (39.6‰) con uno più raro (7,2‰). E' quindi possibile che tale variazione possa causare un effetto dannoso a carico della velocità di trascrizione della proteina, che può venire rallentata. È stato infatti dimostrato che per la codifica del medesimo amminoacido, passando da codoni di maggiore frequenza di utilizzo ad altri con minore frequenza, la traduzione della proteina avviene in maniera più lenta determinando un ripiegamento non corretto e quindi un'alterata funzionalità proteica (Kimchi-Sarfaty et al, 2007).

Le altre due varianti precedentemente descritte (c.198G>A e c.462T>C) in questo studio sono state osservate entrambe nello stesso paziente affetto da SS. Non sappiamo se si tratti di eterozigosi composta o se le due varianti ricadano sullo stesso allele poiché non è ancora stata eseguita una PCR allele specifica per determinarlo. Tuttavia, già dalle osservazioni precedenti di Lee-Kirsch et

al, 2007, queste due variazioni sembrano essere molto rare (frequenza = 0.003 nei dati di Lee-Kirsch; frequenza = 0.001 nella nostra popolazione). Queste due variazioni non sembrano influenzare siti di splicing, né modificano siti di interazioni con le proteine regolatorie dello splicing e non introducono codoni poco usati. Pertanto è probabile che si tratti di varianti ininfluenti del gene *TREX1*.

La variazione c. 144C>G è una nuova variazione riscontrata per la prima volta in questo studio. In base all'algoritmo ESEfinder, potrebbe influire con lo splicing modificando l'interazione del gene con tre diversi fattori di splicing SF2/ASF, SF2/ASF (IgM BRCA1) e SC35. Inoltre attraverso la sostituzione dell'ultima base del codone cioè citosina con guanina, determina il passaggio del codone CCC che ha frequenza di utilizzo pari a 19.8‰ a CCG che presenta una frequenza di utilizzo minore pari a 6.9‰, perciò la velocità di trascrizione della proteina può essere rallentata.

Anche se per alcune variazioni sinonime le analisi in silico non escludono un possibile ruolo funzionale, i nostri dati non supportano un ruolo nelle patologie autoimmuni esaminate. Infatti, ad esclusione della variante c.912G>A già citata, la loro frequenza non risulta significativamente diversa da quelle riportate in letteratura.

Abbiamo inoltre osservato un polimorfismo comune del gene *TREX1* (rs 11797, c.531C>T). Le frequenze alleliche e genotipiche riscontrate nelle tre diverse casistiche di pazienti (LES, SSc e SS) non differiscono in modo statisticamente significativo da quelle riportate sulla banca dati del progetto HapMap per le famiglie CEU (individui di nazionalità caucasioide). Tuttavia, poiché non abbiamo analizzato questo polimorfismo su una casistica di controlli concordi per età e provenienza geografica con i nostri pazienti, non è possibile stabilire con certezza una assenza di associazione tra questo polimorfismo e le patologie in esame.

Abbiamo però osservato una associazione statisticamente significativa tra la presenza del genotipo TT e la positività agli autoanticorpi anti-dsDNA in pazienti affetti da LES ($p=0.0093007$).

Hur et al. 2007, hanno effettuato una analisi genetica sull'intera sequenza trascritta del gene *TREX1* e sulla porzione 5' fiancheggiante su un gruppo di 532 pazienti LES di nazionalità coreana. Dal loro studio l'allele T risultava associato con la negatività agli autoanticorpi anti-dsDNA. Questo diverso risultato può essere causato dalle differenze genetiche tra la popolazione europea e quella coreana. Inoltre poiché sia nel nostro studio che in quello del gruppo coreano non è stata fatta una correzione della significatività statistica per il numero di confronti è possibile che si tratti di scostamenti casuali e pertanto è necessaria una conferma del dato in studi indipendenti. Gli stessi autori hanno osservato, sempre in pazienti affetti da LES, anche una associazione significativa tra la presenza/assenza degli autoanticorpi anti-Ro (SSA) ed un polimorfismo situato nel promotore del gene *TREX1*, che non è stato analizzato in questo studio. I nostri dati non mostrano alcuna

associazione significativa tra il polimorfismo da noi analizzato (rs11797) e la presenza di autoanticorpi anti-Ro.

Gli autoanticorpi anti-DNA sono strettamente associati con il LES e la loro presenza ha una significatività sia diagnostica che prognostica. Poiché il gene *TREX1* è implicato nella regolazione della frammentazione del DNA, è stato ipotizzato che variazioni in *TREX1* possano influenzare la produzione di autoanticorpi anti-dsDNA con incremento dell'apoptosi e inappropriata fagocitosi nei pazienti con il LES. (Hur et al. 2007).

TREX1 potrebbe avere un ruolo nello sviluppo dell'autoimmunità in quanto la sua attività principale consiste nella risposta apoptotica mediata da Granzima A e da Perforina, e nella rimozione di ssDNA o ibridi di DNA:RNA derivati da retroelementi endogeni. Mutazioni di *TREX1* che causino la perdita della funzione esonucleasica, potrebbero causare un accumulo di ssDNA e di ibridi DNA:RNA nel nucleo, scatenando di conseguenza una risposta autoimmune. A conferma di questa ipotesi risulta il fatto che sia nel LES che nella SSc si osserva la presenza di autoanticorpi diretti contro antigeni nucleari.

In conclusione questo studio avvalorava l'ipotesi che varianti rare possano avere un'influenza sulla suscettibilità alle malattie autoimmuni. Per quanto riguarda il gene *PRF1*, osserviamo anche nel LES e nella SSc un'associazione con due polimorfismi con un probabile ruolo funzionale, p.Ala91Val (SSc) e p.Asn252Ser (LES), che era già stato osservato in altre malattie autoimmuni (ALPS, DALD, T1D e SM). Inoltre osserviamo un'associazione con la presenza di variazioni non sinonime rare. Una di queste (p.His514Arg), osservata in un paziente con LES, sembra evidenziare le prove più convincenti di un suo possibile effetto patologico. Per quanto riguarda il gene *TREX1* confermiamo il suo ruolo nella suscettibilità alla SS e identifichiamo un possibile coinvolgimento con la SSc fino ad ora mai analizzata. Nella nostra casistica non confermiamo il coinvolgimento di *TREX1* nella suscettibilità al LES. Infine è interessante considerare come i due geni *PRF1* e *TREX1* codifichino per proteine coinvolte in pathway connessi tra loro, entrambi coinvolti nel meccanismo apoptotico.

BIBLIOGRAFIA

1. Busiello R, Fimiani G, Miano MG, Aricò M, Santoro A, Ursini MV, Pignata C. A91V perforin variation in healthy subjects and FHLH patients. *International Journal of Immunogenetics* 2006; 33:123-125
2. Cannella S, Santoro A, Bruno G, Pillon M, Mussolin L, Mangili G, Rosolen A, Aricò M. Germline mutations of the perforin gene are a frequent occurrence in childhood anaplastic large cell lymphoma. *Cancer*. 2007 Jun 15;109(12):2566-71.
3. 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 and Dianzani U. Variations of the perforin gene in patients with multiple sclerosis. *Genes and Immunity* 2008; 9: 438-444.
4. Clementi R, Chiocchetti A, Cappellano G, Cerutti E, Ferretti M, Orilieri E, Dianzani I, Ferraini 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; 108(9):3079-3084.
5. Clementi R, Locatelli F, Duprè L, Garaventa A, Emmi L, Bregni M, Cefalo G, Moretta A, Danesino C, Comis M, Pession A, Ramenghi U, Maccario R, Aricò M, Roncarolo MG. A proportion of patients with lymphoma may harbor mutations of the perforin gene. *Blood* 2005
6. Fischer A, Latour S, de Saint Basile G. Genetic defects affecting lymphocyte cytotoxicity. *Current Opinion in Immunology* 2007; 19:1-6
7. Henter JI, Elinder G, Söder O, Hansson M, Andersson B, Andersson U. Hypercytokinemia in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 1991 Dec 1;78(11):2918-22
8. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [letter]. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725
9. Hur J.W., Sung Y.K., Shin H.D., Park B.L., Cheong H.S. and Bae S.C. (2007) *Rheumatology International*.
10. Hur JW, Sung YK, Shin HD, Park BL, Cheong HS, Bae SC. TREX1 polymorphisms associated with autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 2008 Jun;28(8):783-9. Epub 2007 Dec 19.
11. Jarjanazi H, Savas S, Pabalan N, Tennis JW, Ozcelik H. Biological implications of SNPs in signal peptide domains of human proteins. *Proteins* 2008; 70:394-403
12. Kavanagh D., Spitzer D., Kothari P.H., Shaikh A., Liszewski M.K., Richards A. and Atkinson J.P. (2008) *Cell Cycle*. 7, 1718-1725
13. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*. 2007;315(5811):525-8.
14. Komar AA. Genetics. SNPs, silent but not invisible. *Science* 2007; 315(5811):466-7.
15. Lee-Kirsch M.A., Gong M., Schulz H., Ruschendorf F., Stein A., Pfeiffer C., Ballarini A., Gahr M., Hubner N. and Linné M. (2006) *The American Journal of Human Genetics*. 79, 731-737
16. Lee-Kirsh M.A., Chowdhury D., Harvey S., Gong M., Senenko L., Engel K., Pfeiffer C., Hollis T., Gahr M., Perrino F.W., Lieberman J. and Hübner N. (2007) *Journal molecular medicine*. 85, 531-537
17. Lee-Kirsh M.A., Gong M., Chowdhury D., Senenko L., Engel K., Lee Y.-A, Udesh de Silva, Bailey S.L, Witte T., Vyse T.J., Kere J., Pfeiffer C., Harvey S., Wong A., Koskenmies S., Hummel O., Rohde K., Schmidt R.E., Dominiczak A.F., Gahr M., Hollis T., Perrino F.W., Lieberman J. and Hübner N. (2007) *Nature Genetics*. 39, 1065-1067
18. Molleran Lee S, Villanueva J, Sumegi J, Zhang K, Kogawa K, Davis J, Filipovich AH. Characterization of diverse PRF1 mutations leading to decreased natural killer cell activity in North American families with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet* 2004;41:137-144.
19. Morita M., Stamp G., Robins P., Dulie A., Rosewell I., Hrivnak G., Daly G., Lindahl T. and Barnes D.E. (2004) *Molecular and Cellular Biology*. 24, 6719-6727
20. 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; 57(4):1078-83
21. Pinkoski MJ & Green DR. Granzyme A: the road less travelled. *Nature Immunology* 2003; 4(2):107-108
22. Rice G., Newman W.G., Dean J., Patrick T., Parmar R., Flintoff K., Robins P., Harvey S., Hollis T., O'Hara A., Harrick A.L., Bowden A.P., Perrino F.W., Lindahl T., Barnes D.E., and Crow Y.J. (2007) *The American Journal of Human Genetics*. 80, 811-815
23. Rice G., Patrick T., Parmar R., Taylor C.F., Aeby A., Aicardi J et al.(2007) *The American Journal of Human Genetics*. 81, 713-725
24. Richards A., Van den Maagdenberg A.M.J.M., Jen J.C., Kavanagh D., Bertram P., Spitzer D., Liezewski M.K., Barilla-LaBarca M.-L., Terwindt G.M., Kasai Y., McLellan M., Grand M.G, Vanmolkot K.R.J., de Vries B., Wan J., Kane M.J., Mamsa H., Schäfer R., Stam A.H., Haan J., de Jong P.T.V.M., Storimans C.W., Van Schooneveld M.J., Oosterhuis J.A., Gschwendter A., Dichgans M., Kotschet K.E., Hodgkinson S., Hardy T.A., Delatycki M.B., Hajj-Ali R.A., Kothari P.H., Nelson S.F., Frants R.R., Baloh R.W., Ferrari M.D. and Atkinson J.P. (2007) *Nature Genetics*. 39, 1068-1070

25. Risma KA, Frayer RW, Filipovich AH, Sumegi J. Aberrant maturation of mutant perforin underlies the clinical diversity of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *The Journal of Clinical Investigation* 2006; 116(1):182-192
26. Solomou EE, Gibellini F, Stewart B, Malide D, Berg M, Visconte V, Green S, Childs R, Chanock SJ, Young NS. Perforin gene mutations in patients with acquired aplastic anemia. *Blood*. 2007 Jun 15;109(12):5234-7. Epub 2007 Feb 20.
27. Stadt UZ, Beutel K, Kolberg S, Schneppenheim R, Kabisch H, Janka G, Hennies HC. Mutation spectrum in children with primary hemophagocytic lymphohistiocytosis: molecular and functional analyses of PRF1, UNC13D, STX11, and RAB27A. *Human Mutation* 2006; 27(1):62-68
28. Stestson D.B., Ko J.S., Heidmann T., and Medzhitov R. (2008) *Cell*. 134, 587-598
29. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*. 1980; **23**: 581–590.
30. Trambas C, Gallo F, Pende D, Marcenaro S, Moretta L, De Fusco C, Santoro A, Notarangelo L, Arico M, Griffiths GM. A single amino acid change, A91V, leads to conformational changes that can impair processing to the active form of perforin. *Blood* 2005;106(3):932-937.
31. Trizzino A, zur Stadt U, Ueda I, Risma K, Janka G, Ishii E, Beutel K, Sumegi J, Cannella S, Pende D, Mian A, Henter JI, Griffiths G, Santoro A, Filipovich A, Aricò M; Histiocyte Society HLH Study group. Genotype-phenotype study of familial haemophagocytic lymphohistiocytosis due to perforin mutations. *J Med Genet*. 2008 Jan;45(1):15-21. Epub 2007 Sep 14.
32. Udesch de Silva, Choudhury S., Bailey S.L., Harvey S., Perrino F.W., and Hollis T. (2007) *Journal of Biological Chemistry*. 282, 10537-10543
33. Vastert B, Van Wijk R, D'Urbano L, De Vooght K, Ravelli A, Cortis E, Hoppenreijns E, Van Solinge W, Prakken B, Wulffraat N, De Benedetti F, Kuis W. Mutations in the perforin gene may be linked to macrophage activation syndrome in patients with systemic onset Juvenile Idiopathic Arthritis. *The Turkish Journal of Pediatrics* 2008; 50 (Supplement):2.
34. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology* 2006;6:940-952
35. 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(12):4700-4706.
36. Yang YG, Lindahl T, Barnes DE. Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):873-86.

SEZIONE 2:
ATTIVITA' FORMATIVA

CORSI FREQUENTATI (anno 2007-2008)

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

CORSI FREQUENTATI (anno 2008-2009)

-Journal Club in lingua inglese – Prof.ssa Mara Giordano.

SEMINARI FREQUENTATI (anno 2008-2009)

-20/11/2008 - Dott.ssa Antonietta Barbieri: **La valutazione dei percorsi assistenziali come intervento complesso**

-5/12/2008 - Prof. Luca Santi: **Production of bio-farmaceuticals in plants**

-11/12/2008 - Dott. Piero Bestagini: **“Valori critici di bmi, hb e cv in pazienti adulti e adolescenti HIV+ per la diagnosi clinica di tubercolosi polmonare in Africa**

-12/12/2008 – Prof. Antonio Uccelli: Le cellule Mesenchimali Staminali per il trattamento delle malattie neurologiche.

-18/12/2008 - Prof. Giuseppe Faggian: **Patologia della radice aortica: dalla clinica alla biologia molecolare**

-9/01/2009 Prof. Riccardo Troncone: **La malattia celiaca**

-13/01/2009 - Prof. Francesco Zaja: **Porpora trombocitopenica autoimmune: nuovi orientamenti fisiopatologici e terapeutici**

-27/01/2009 – Prof. Marco Salvetti:: Interazioni geni - ambiente nella eziologia della SM: studi sui gemelli

-5/02/2009 - Dott.ssa Cinzia Borgogna: **Il gene interferon-inducibile IFI16 nella cute come bersaglio patogenetico nello sviluppo di patologie autoimmuni**

-10/02/2009 – Prof. Antonio Musaro: Non solo motoneuroni: il contributo del muscolo scheletrico alla patogenesi della sclerosi laterale amiotrofica

-12/02/2009 - Prof.ssa G. Bianchi Scarrà: **Ruolo dei polimorfismi dei geni della pigmentazione nell'induzione di mutazioni somatiche nei melanomi**

-19/02/2009 - Prof. J Nelson: **The use of cytomegalovirus as a novel vaccine vector for Simian Immunodeficiency Virus**

-20/02/2009 - Prof. Giannino Del Sal: **When a fine tuner of signaling pathways becomes a dangerous amplifier: the case of the Prolyl-isomerase Pin1 in cancer**

-25/02/2009 - Prof. Gaetano Thiene: **CONFERENZA SU: "Linee guida per il riscontro diagnostico sulla morte improvvisa"**

-26/02/2009 - Dott.ssa Gatti Silvia: **Analisi del comportamento cellulare in seguito a stimolazione meccanica con uso di bioreattore**

- 5/03/2009 - Dott.ssa Elisa Zavattaro - Dott.ssa Valentina Dell'Oste: **Ruolo dei Papillomavirus umani nella carcinogenesi cutanea: nuovi approcci clinici e molecolari**
- 18/03/2009 - Prof. Piero Pucci: **La proteomica: un nuovo modo di guardare al mondo delle proteine**
- 18/03/2009 - Prof. Giorgio Stassi: **Cellule staminali tumorali: implicazioni terapeutiche**
- 19/03/2009 - Prof. G. Peluso: **Le nanotecnologie applicate alla medicina**
- 23/03/09 - Dott. Salvatore Timpanaro: **Enzima P e il Social Network per l'Innovazione**
- 23/03/2009 - Prof. Roberto Merletti: **Tecnologie innovative in ergonomia, ginecologia, medicina del lavoro e dello sport**
- 02/04/2009 - Prof.ssa Bernadette Biondi: **Carcinoma differenziato della tiroide: novità nel follow-up e nella terapia**
- 09/04/2009 - Dott.ssa Sara Mantero: **I bioreattori nella Medicina Rigenerativa: dalla ricerca alla realtà di una start-up**
- 22/04/2009 - Prof. Davide Schiffer: **Patologia dei tumori cerebrali. Recenti acquisizioni in tema di diagnosi e prognosi**
- 23/04/2009 - Dott. ssa Giuseppina Nicotra: **Localizzazione tissutale di molecole coinvolte nei meccanismi di progressione tumorale**
- 28/04/2009 - Dott.ssa Anna Boletta: **Polycystin-1, the product of the PKD1 gene mutated in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD), is an orphan receptor regulating cell migration and polarity**
- 30/04/2009 - Prof. Antonio Sica: **Polarized inflammation in tumour development**
- 6/05/2009 - Dr.ssa Barbara Palazzo: **Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: design of stimuli-responsive nanomaterials for cancer diagnosis and therapy**
- 05/05/2009 - Prof. Amedeo Columbano: **Effetti anti-steatogeni ed anti-tumorali degli agonisti del recettore dell'ormone tiroideo**
- 07/05/2009 - Dott. Davide Rossi: **Trasformazione da leucemia linfatica cronica a linfoma aggressivo: patogenesi, progressione e prognosi**
- 12/05/2009 - Prof. Giuseppe Poli: **Ipercolesterolemia e progressione di malattia in patologia umana**
- 12/05/2009 - Prof. Angelo Poletti: **Neurotossicità delle proteine 'misfolded' nelle malattie del motoneurone**
- 14/05/2009 - Prof. V. Corno: **Tecniche di split liver nel trapianto di fegato adulto e pediatrico**
- 14/05/2009 - Prof Stefano Gustincich: **Functional Genomics of Brain**
- 21/05/2009 - Prof. L. di Luigi: **Il Doping ormonale: aspetti clinici e legislativi**
- 28/05/2009 - Dott. ssa Rosanna Vaschetto: **Mediatori in terapia intensiva: specificità da organo nella sepsi e implicazioni cliniche**
- 03/06/2009 - Prof. M. Baccarini: **Role of Raf in tumorigenesis**
- 10/06/2009 - Prof. Milo Frattini: **Marcatori molecolari nel carcinoma coloretale: dalla teoria alla pratica clinica**
- 18/06/2009 - Dott. ssa Monia Lunghi: **Clonalità linfocitaria in pazienti con neutropenia cronica idiopatica**
- 25/06/2009 - Dott. Pierluigi Ingrassia: **Nuove tecnologie didattiche nella formazione in Medicina d'Emergenza**

-02/07/2009 - Dott. Silvio Zanaboni: Sedazione **a lungo termine mediante Propofol in anestesia generale per bambini**

-06/07/2009 - Prof. E. Berti: **Il Lupus Eritematoso Cutaneo: quadro clinico ed immunopatologico**

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

-20/12/2007 - Prof. Ciro Isidoro: **Symposium in: NANOTECHNOLOGY AND BIOIMAGING novel approaches in diagnosis and drug delivery**

-XI Congresso Nazionale SIGU Genova, 23-25 Novembre 2008

-28/01/2009 – ARESS: **iniziativa formativa: L'appropriatezza dei test genetici nel campo delle malattie complesse (Celiachia, Diabete tipo I, Trombofilia) e della farmacogenetica**

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

A) *Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)*

B) *Altre comunicazioni*

-D'Alfonso S, Bolognesi E, Guerini FR, Bergamaschi L, **Barizzone N**, Ferrante D, Castelli L, Bocca S, Agliardi C, Ferrante P, Naldi P, Maurizio Leone M, Caputo D, Ballerini C, Salvetti M, Galimberti D, Massacesi L, Trojano M, Momigliano-Richiardi P.

Associazione di una variazione di sequenza nel gene MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) con la suscettibilità alla Sclerosi Multipla (SM)

X congresso nazionale SIGU, Salsomaggiore Terme, novembre 2007

-**Barizzone N**, Marchini M, Cappiello F, Chiocchetti A, Nicola S, Ferrante D, Corrado L, Mellone S, Scorza R, Dianzani U, Momigliano-Richiardi P, D'Alfonso S.

Associazione di un polimorfismo del gene dell'osteopontina con la sclerosi sistemica (sclerodermia)
Verrà presentato al: Congresso AIBT - Verbania, 1-3 ottobre 2009

ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO (elenco completo)

-Ferreiro-Neira I, Calaza M, Alonso-Perez E, Marchini M, Scorza R, Sebastiani GD, Blanco FJ, Rego I, Pullmann R Jr, Pullmann R, Kallenberg CG, Bijl M, Skopouli FN, Mavromati M, Migliaresi S, **Barizzone N**, Ruzickova S, Dostal C, Schmidt RE, Witte T, Papasteriades C, Kappou-Rigatou I, Endreffy E, Kovacs A, Ordi-Ros J, Balada E, Carreira P, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Opposed independent effects and epistasis in the complex association of IRF5 to SLE.

Genes Immun. 2007 8(5):429-38.

-D'Alfonso S, Bolognesi E, Guerini FR, **Barizzone N**, Bocca S, Ferrante D, Castelli L, Bergamaschi L, Agliardi C, Ferrante P, Naldi P, Leone M, Caputo D, Ballerini C, Salvetti M, Galimberti D, Massacesi L, Trojano M, Momigliano-Richiardi P.

A sequence variation in the MOG gene is involved in multiple sclerosis susceptibility in Italy.

Genes Immun. 2008 9(1):7-15.

-Kozyrev SV, Abelson AK, Wojcik J, Zaghlool A, Linga Reddy MV, Sanchez E, Gunnarsson I, Svenungsson E, Sturfelt G, Jönsen A, Truedsson L, Pons-Estel BA, Witte T, D'Alfonso S, **Barizzone N**, Danieli MG, Gutierrez C, Suarez A, Junker P, Laustrup H, González-Escribano MF, Martin J, Abderrahim H, Alarcón-Riquelme ME.

Functional variants in the B-cell gene BANK1 are associated with systemic lupus erythematosus.

Nat Genet. 2008 40(2):211-6.

Erratum in: *Nat Genet.* 2008 Apr;40(4):484. Barizzone, Nadia [corrected to Barizzone, Nadia].

-Cappellano G, Orilieri E, Comi C, 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 9(5):438-44.

-Liu K, Li QZ, Delgado-Vega AM, Abelson AK, Sánchez E, Kelly JA, Li L, Liu Y, Zhou J, Yan M, Ye Q, Liu S, Xie C, Zhou XJ, Chung SA, Pons-Estel B, Witte T, de Ramón E, Bae SC, **Barizzone N**, Sebastiani GD, Merrill JT, Gregersen PK, Gilkeson GG, Kimberly RP, Vyse TJ, Kim I, D'Alfonso S, Martin J, Harley JB, Criswell LA; Profile Study Group; Italian Collaborative Group; German Collaborative Group; Spanish Collaborative Group; Argentinian Collaborative Group; SLEGEN Consortium, Wakeland EK, Alarcón-Riquelme ME, Mohan C.

Kallikrein genes are associated with lupus and glomerular basement membrane-specific antibody-induced nephritis in mice and humans.

J Clin Invest. 2009 119(4):911-23.

-Bergamaschi L, Leone M, Fasano ME, Guerini FR, Ferrante D Bolognesi E, **Barizzone N**, Corrado L, Naldi P, Agliardi C, Dametto E, Salvetti M, Visconti A, Galimberti D, Scarpini E, Cavalla P, Bergamaschi R, Monaco F, Caputo D, Momigliano-Richiardi P, D'Alfonso S.

HLA class I markers and Multiple Sclerosis susceptibility in the Italian population.

Accepted by *Genes Immun.*

-Sánchez E, Palomino-Morales RJ, Ortego-Centeno N, Jiménez-Alonso J, González-Gay MA, López-Nevot MA, Sánchez-Román J, de Ramón E, González-Escribano MF, Pons-Estel BA, D'Alfonso S, Sebastiani GD; Italian collaborative group, Alarcón-Riquelme ME, Martín J.

Collaborators: **Barizzone N**, Galeazzi M, Danieli MG, Migliaresi S, Bozzolo E.

Identification of a new putative functional IL18 gene variant through an association study in systemic lupus erythematosus.

Hum Mol Genet. 2009 Oct 1;18(19):3739-48. Epub 2009 Jul 7