

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



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

*Analisi del gene UNC13D in pazienti affetti da  
sclerosi multipla e diabete mellito di tipo 1.*

**RESPONSABILE:  
Dr. Cristoforo COMI**

**CANDIDATO:  
Sara BUTTINI**

## INTRODUZIONE

- Malattie autoimmuni
- Sclerosi multipla
- Diabete mellito insulino-dipendente
- Apoptosi: meccanismo di morte cellulare programmata
- Citotossicità cellulo-mediata e meccanismo di esocitosi dei granuli citotossici
- Il gene UNC13D
- Scopo del lavoro

## MATERIALI E METODI

- Pazienti
- Estrazione di DNA da sangue
- Quantificazione spettrofotometrica del DNA
- PCR (*Polymerase Chain Reaction*)
- Elettroforesi su gel di agarosio
- Sequenziamento automatico
- Analisi statistica

## RISULTATI

## DISCUSSIONE

## BIBLIOGRAFIA

# INTRODUZIONE

## MALATTIE AUTOIMMUNI

Il sistema immunitario è costituito da un insieme di meccanismi che si sono sviluppati nel corso dell'evoluzione per proteggere l'organismo dall'invasione di patogeni. L'elemento chiave del sistema immunitario consiste nella capacità distinguere le molecole estranee degli agenti invasori dalle componenti proprie dell'organismo (discriminazione tra *self* e *non-self*). Il riconoscimento di un patogeno da parte del sistema immunitario porta all'attivazione di una risposta effettrice che elimina o neutralizza l'agente invasore.

Con il termine immunità si intende lo stato di protezione dalle malattie infettive ed è costituita da due sistemi, immunità innata ed immunità acquisita, che cooperano insieme per la protezione dell'organismo.

L'immunità innata comprende meccanismi molecolari e cellulari presenti nell'organismo precedentemente all'infezione ed è costituita da meccanismi di resistenza alle malattie che non sono specifici per un particolare patogeno, ma comprendono componenti molecolari e cellulari che riconoscono classi di patogeni molto comuni. Le cellule interessate in questo tipo di difesa sono le cellule fagocitiche (macrofagi e monociti) e i granulociti neutrofili.

L'immunità acquisita o specifica, invece, riconosce ed elimina selettivamente microrganismi e molecole estranee (*non-self*). È caratterizzata da:

- specificità per l'antigene (è in grado di distinguere minime differenze tra gli antigeni)
- diversità (riconosce strutture differenti presenti su antigeni estranei)
- memoria (una seconda esposizione allo stesso antigene scatena una risposta immunitaria più rapida ed efficace)
- discriminazione tra ciò che è parte dell'organismo (*self*) da ciò che non lo è (*non-self*).

Questo tipo di risposta coinvolge linfociti T e B attivati da antigeni *self*. I linfociti B vergini riconoscono ogni tipo di macromolecola solubile, mentre i linfociti T riconoscono peptidi processati e presentati dalle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) espresse sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (APC) come i macrofagi, le cellule dendritiche e i linfociti B.

L'attivazione linfocitaria è accompagnata da modificazioni dell'espressione sulla superficie cellulare di molecole coinvolte nella proliferazione e nella funzione effettrice dei linfociti, che portano all'espansione dei linfociti specifici per quell'antigene e al loro differenziamento in cellule effettrici.

Per i linfociti B le cellule effettrici sono le plasmacellule che secernono anticorpi, mentre per le cellule T i linfociti T helper (Th) secernono citochine che richiamano i fagociti per l'eliminazione del patogeno e i linfociti T citotossici (CTL), che sono invece dotati di attività citotossica.

In seguito all'attivazione i linfociti esprimono diversi geni che codificano per molecole coinvolte nello spegnimento della risposta immune che inducono l'apoptosi della maggior parte dei linfociti effettori diversi giorni dopo la loro attivazione. Tuttavia una piccola popolazione di cellule attivate sopravvive e costituisce i linfociti memoria, che sono in grado di rispondere in modo più rapido ed efficiente ad una nuova esposizione con lo stesso antigene (risposta secondaria).

Lo spegnimento della risposta immunitaria è fondamentale per il controllo del numero dei linfociti periferici e per ridurre il rischio di cross-reattività tra antigeni *self* e *non-self*.

Quando il sistema immunitario reagisce contro antigeni autologhi (*self*) si sviluppano le malattie autoimmuni. In questa condizione le cellule e gli organi dell'individuo subiscono un danno ad opera di autoanticorpi (come avviene nella tiroidite di Hashimoto e nell'anemia emolitica autoimmune) e linfociti T autoreattivi (come avviene nell'artrite reumatoide, nella sclerosi multipla e nel diabete mellito insulino-dipendente), che porta allo sviluppo di malattie croniche e acute, a volte con conseguenze fatali.

Esistono dei meccanismi di tolleranza che proteggono l'individuo da linfociti potenzialmente autoreattivi. Un meccanismo primario, detto *tolleranza centrale*, si verifica negli organi linfatici primari, midollo osseo e timo ed elimina i cloni di linfociti B e T che riconoscono antigeni *self* prima della loro maturazione. I linfociti autoreattivi che riescono a raggiungere gli organi linfatici secondari sono eliminati o inattivati da meccanismi di *tolleranza periferica*, quali l'induzione di morte cellulare programmata (apoptosi), di anergia cellulare (non responsività all'antigene) o tramite l'azione dei linfociti T<sub>reg</sub>. Questi meccanismi riducono l'efficacia o il tempo di sopravvivenza dei linfociti autoreattivi e quindi riducono la possibilità di arrecare un danno prolungato all'organismo. Nonostante questi sistemi di regolazione, cloni di linfociti B e T autoreattivi sono attivati occasionalmente generando risposte umorali o cellulo-mediate contro antigeni *self*.

La sola presenza di linfociti autoreattivi generalmente non innesca il fenomeno dell'autoimmunità, ma sono necessari altri fattori come ad esempio l'infezione da parte di agenti infettivi, spesso di natura virale, i fattori ambientali, il sesso e la perdita delle cellule regolatorie. Gli agenti infettivi sono in grado di innescare reazioni autoimmuni attraverso diversi meccanismi:

- in seguito al danno tissutale si liberano antigeni normalmente sequestrati che vengono riconosciuti dal sistema immunitario come non *self*
- presentano antigeni simili ad antigeni *self*, per cui una volta terminata l'infezione il sistema immunitario reagisce contro questi antigeni (mimetismo molecolare)

- innesco di una risposta infiammatoria localizzata con conseguente aumento della produzione di citochine proinfiammatorie. Queste ultime determinano l'espressione di molecole MHC nelle APC che aumenta la capacità di presentare antigeni e la presenza di molecole costimolatorie con la conseguente attivazione di linfociti autoreattivi
- attivazione policlonale non specifica di numerosi cloni di linfociti B con conseguente produzione di autoanticorpi.

I meccanismi appena descritti non sono mutualmente esclusivi, ma possono intervenire insieme e questo determina il fenomeno conosciuto come *epitope spreading*, molto frequente nelle malattie autoimmuni. Infatti nel corso della malattia si passa da una fase iniziale dove la risposta immune è diretta verso un singolo epitopo di una proteina *self*, ad una risposta autoimmune più vasta indirizzata verso epitopi diversi della stessa proteina e verso proteine diverse (espansione epitopica).

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 che predispone allo sviluppo di malattie autoimmuni: è stato dimostrato che la produzione massiva di estrogeni nella donna altera alcune funzioni dei linfociti B. Infine, alterazioni nel numero e nella funzionalità dei linfociti T regolatori CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> contribuiscono all'autoimmunità.

Le malattie autoimmuni colpiscono il 5-10% della popolazione dei paesi occidentali. Sulla base della localizzazione del danno tissutale, le patologie autoimmuni possono essere suddivise in due grandi categorie: organo specifiche e sistemiche.

Nelle malattie autoimmuni organo-specifiche la risposta immunitaria è diretta contro un antigene espresso selettivamente da un certo organo, per cui le manifestazioni della malattia sono limitate a quel particolare organo es. diabete mellito insulino-dipendente. Nelle malattie autoimmuni che sistemiche invece la risposta è diretta contro un ampio spettro di antigeni bersaglio espressi in numerosi tessuti quindi coinvolge più organi e tessuti, come nel lupus eritematoso e nella sclerosi multipla.

Dal punto di vista del meccanismo immunopatogenetico, le malattie autoimmuni possono essere mediate da anticorpi oppure da cellule. Le prime comprendono malattie come le emocitopenie autoimmuni, causate da autoanticorpi contro vari tipi di cellule del sangue, oppure il lupus eritematoso sistemico, causato dalla deposizione in vari tessuti di immunocomplessi formati principalmente da anticorpi contro complessi DNA-istoni o RNA-ribonucleoproteine e i rispettivi autoantigeni. Fanno parte di questa categoria anche alcune malattie autoimmuni organo-specifiche causate da autoanticorpi capaci di esercitare un'attività agonista o antagonista sull'organo bersaglio; ad esempio nel morbo di Graves-Basedow anticorpi anti-recettore del TSH causano iperfunzione tiroidea, mentre nella miastenia grave anticorpi contro il recettore dell'acetilcolina inibiscono la

trasmissione dell'impulso neuromuscolare. Le malattie autoimmuni cellulo-mediate sono una categoria in continua crescita e sono mediate principalmente da linfociti T helper di tipo 1 (Th1), caratterizzati dalla produzione delle citochine proinfiammatorie IL-2, IFN $\gamma$  e Linfotossina, e da linfociti T citotossici (Tc). Esempi di questo tipo di malattie autoimmuni sono il diabete mellito insulino-dipendente oppure la sclerosi multipla in cui i linfociti Th1 e Tc aggrediscono rispettivamente le cellule  $\beta$  del pancreas e la mielina del sistema nervoso centrale. In queste malattie si osserva la produzione di autoanticorpi, che sono considerati utili marcatori dello sviluppo della malattia, conseguenza del fenomeno dell'*epitope spreading* anche se hanno un modesto ruolo patogenetico.

Le malattie autoimmuni presentano un certo grado di familiarità e si ha un quadro simile alle malattie multifattoriali: diversi geni possono influire nella suscettibilità genetica allo sviluppo della malattia che richiede, comunque, l'induzione da parte di fattori scatenanti (età, sesso, background genetico, esposizione a fattori infettivi e ambientali) [1].

## **SCLEROSI MULTIPLA**

La sclerosi multipla è una malattia infiammatoria cronica del sistema nervoso centrale (SNC), associata a demielinizzazione e danno assonale [2], che si manifesta tipicamente con episodi di disfunzione del sistema visivo, motorio o sensoriale, a seconda dell'area colpita.

La malattia, che in Italia ha una prevalenza di circa 100 casi ogni 100.000 abitanti, colpisce con frequenza doppia le donne rispetto agli uomini e, generalmente, insorge tra i 20 e i 40 anni, ma, raramente, può essere diagnosticata in bambini di età inferiore a 10 anni o al di sopra dei 50 anni di età. La malattia si distribuisce, inoltre, con frequenza disomogenea nelle diverse aree del pianeta: è più frequente nel nord Europa, nella zona meridionale del Canada e settentrionale degli USA, Sud Africa, Australia e Nuova Zelanda.

L'80%-85% dei pazienti segue un decorso di malattia di tipo recidivante-remittente (SM-RR), caratterizzato da episodi sintomatici acuti, seguiti da una fase di remissione in cui non si ha, però, un recupero totale. Il 50% di questi pazienti entra, poi, in fase secondariamente progressiva (SM-SP), in cui si assiste ad un declino costante delle funzionalità neurologiche. Il 15%-20% dei pazienti a cui viene diagnosticata la sclerosi multipla è affetto, invece, dalla forma primariamente progressiva (SM-PP), in cui fin dall'insorgere dei primi sintomi vi è un costante peggioramento delle condizioni neurologiche [3].

L'eziologia della sclerosi multipla rimane ancora poco nota. È molto probabile si sviluppi in individui geneticamente suscettibili, in interazione con fattori ambientali. Tra questi ultimi sono stati proposti numerosi virus, tra cui herpes simplex 1 o 2, il citomegalovirus, il virus Epstein- Barr

ed il virus della rosolia. Secondo la cosiddetta “ipotesi dell'igiene”, formulata alla luce della distribuzione geografica della malattia, l'età di infezione da parte di uno di questi virus gioca un ruolo fondamentale: laddove il livello di igiene è più elevato, la patologia è più diffusa, in quanto i virus che la innescerebbero vengono contratti in età più avanzata, provocando una risposta deregolata all'infezione.

Sono stati identificati anche alcuni fattori di suscettibilità genetica, per esempio la regione MHC di classe II nel *locus* 6p21, il recettore per interleuchina 2 (IL2RA) e quello per IL-7 (IL7R). Altri fattori sono tutt'ora sotto indagine, come osteopontina (OPN), la proteina basica della mielina (MBP), interferone  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) e IL-2 [4].

Una volta che il sistema immunitario è stato attivato dallo stimolo ambientale, i linfociti T autoreattivi attivati in periferia superano la barriera emato-encefalica. Essi vi aderiscono mediante proteine di adesione (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina) e secernono metalloproteasi, che degradano la matrice. All'interno del SNC astrociti, microglia e macrofagi si comportano da cellule APC e causano l'attivazione di linfociti T CD4+, che sono in grado di differenziare in linfociti Th1 o Th2. I linfociti Th1 secernono TNF- $\alpha$ , che regola positivamente i linfociti CD8+, che a loro volta possono attaccare la mielina riconoscendo MHC di classe I sugli oligodendrociti; i linfociti Th2 possono attivare i linfociti B, che contribuiscono alla distruzione della mielina mediante anticorpi [5,6]. Se sul ruolo di linfociti B, linfociti T CD4+ e CD8+ si è fatto almeno parzialmente luce, rimane dubbio il coinvolgimento delle cellule NK nella patogenesi della sclerosi multipla. A questa popolazione cellulare sono stati, infatti, attribuiti sia ruoli protettivi, come la soppressione diretta di linfociti T e cellule dendritiche (APC) o la stimolazione di linfociti Treg, sia meccanismi promotori della malattia, come la stimolazione di linfociti Th1, l'attivazione di cellule dendritiche e il danno tissutale diretto [7].

## **DIABETE MELLITO DI TIPO 1**

Il diabete mellito di tipo 1 (T1DM) rappresenta una delle più gravi forme di diabete, nella quale la distruzione delle cellule  $\beta$  del pancreas porta all'incapacità di produrre insulina. Si distinguono due diverse forme: diabete mellito di tipo 1A (o immunomediato) che insorge in seguito alla distruzione delle cellule  $\beta$  e ha un esordio precoce (giovanile) o un esordio più lento ((Latent Autoimmune Diabetes-LADA, in soggetti adulti) e diabete mellito di tipo 1B (o idiopatico), meno frequente. La malattia colpisce prevalentemente i bambini e gli adolescenti.

L'eziologia della malattia resta ancora in gran parte sconosciuta, ma è influenzata da fattori genetici e da fattori ambientali. Per quanto riguarda i fattori genetici particolari combinazioni alleliche degli antigeni HLA (DR3/DR2) predispongono allo sviluppo della malattia, mentre i fattori

ambientali coinvolti nella risposta autoimmune che porta alla distruzione delle cellule  $\beta$  includono infezioni virali (enterovirus, virus della rosolia e coxsackie virus), tossine e alimenti (proteine del latte, cereali, glutine).

L'eccessiva attivazione del sistema immunitario mediato dalle cellule T in soggetti predisposti porta ad una risposta infiammatoria all'interno delle isole pancreatiche (insuliti) e ad una risposta umorale (mediata dai linfociti B) che conduce alla produzione di anticorpi diretti contro antigeni pancreatici. Sono stati individuati numerosi autoanticorpi rivolti verso le varie strutture delle isole pancreatiche (ICA, *islet cell autoantibodies*), che sono considerati marcatori predittivi della malattia, utilizzati anche a livello diagnostico, tra i quali GADA (*glutamic acid decarboxylases autoantibodies*) rivolti contro la glutammato decarbossilasi, IA-2 (IA-2A autoantibodies) e IAA (*insulin autoantibodies*) rivolti contro l'insulina nativa.

Sia i linfociti T-Helper ( $CD4^+$ ) che i linfociti citotossici ( $CD8^+$ ) rappresentano importanti effettori finali nella distruzione delle cellule  $\beta$ , ma anche i macrofagi e le cellule dendritiche giocano un ruolo importante, non solo come cellule presentanti l'antigene, ma anche come fonte di radicali dell'ossigeno o di altri mediatori citotossici solubili.

Perforina, Fas e il suo ligando (FasL),  $TNF\alpha$ , IL-1,  $INF\gamma$ , NO sono tutte molecole che sembrano essere coinvolte nell'apoptosi cellulare, anche se non è ancora nota quale sia tra queste la molecola che svolge il ruolo cruciale nella fase finale di sviluppo della malattia.

## **APOPTOSI: MECCANISMO DI MORTE CELLULARE PROGRAMMATA**

L'apoptosi o "morte cellulare programmata" riveste un ruolo critico nella regolazione dell'equilibrio del sistema immunitario.

L'apoptosi è il meccanismo chiave per la selezione dei linfociti B e T nelle loro sedi di maturazione (midollo osseo e timo). Durante questa fase i linfociti subiscono un riarrangiamento dei geni che codificano per vari recettori (Ig per i linfociti B e TCR per i linfociti T). Il processo di selezione clonale porta alla morte per apoptosi dei linfociti con alta affinità per gli antigeni self. In particolare vengono eliminati i linfociti B immaturi che esprimono autoanticorpi contro antigeni *self* presenti nel midollo osseo (selezione negativa), mentre nel timo vengono eliminati i linfociti T che riconoscono molecole MHC self ad alta affinità o che riconoscono autoantigeni presentati da molecole MHC self.

Tuttavia, non tutti i cloni autoreattivi vengono eliminati, in quanto non tutti gli antigeni *self* sono rappresentati nel midollo osseo e nel timo. L'immissione in periferia di questi linfociti T non porta

necessariamente allo sviluppo di malattie autoimmuni in quanto queste cellule possono ancora essere controllate da meccanismi di tolleranza periferica.

L'attivazione del linfocita richiede la presenza di due segnali distinti: presenza di un antigene su molecole MHC e presenza di molecole costimolatorie che interagiscono con i loro rispettivi ligandi presenti sulle cellule APC. Il riconoscimento dell'antigene in assenza del secondo segnale conduce ad uno stato di quiescenza (anergia) o apoptosi del linfocita. In questo modo, l'attivazione dei linfociti avviene soltanto in un contesto infiammatorio durante il quale le APC esprimono molecole costimolatorie riducendo il rischio di aggressioni contro il *self*.

L'apoptosi svolge anche un importante ruolo anche nella citotossicità cellulo-mediata (vedi capitolo successivo), dove regola la risposta immunitaria, mantenendo l'omeostasi dei linfociti dopo il processo di proliferazione indotto dall'incontro con l'antigene.

Per quanto riguarda il sistema immunitario, diversi stimoli sono in grado di attivare differenti vie di segnalazione di morte cellulare:

- La "via estrinseca" è stimolata dall'interazione ligando-recettore e porta alla formazione di un complesso capace di attivare la cascata delle caspasi
- La "via intrinseca" è stimolata da condizioni di stress cellulare (mancanza di fattori di crescita, raggi UV...) che porta alla formazione di un complesso detto apoptosoma.
- La "via di salvataggio" (autofagia) è coinvolta nel mantenimento dell'omeostasi cellulare e in alcune circostanze può portare alla morte cellulare.

Nella via estrinseca i recettori (TNF-R1, TNF-R2, Fas/CD95, DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR6) appartenenti alla famiglia del recettore del fattore di necrosi tumorale interagiscono con i rispettivi ligandi extracellulari (appartenenti alla famiglia del TNF) e inducono la segnalazione della via apoptotica. Ad esempio il ligando extracellulare (FasL) interagisce e induce la trimerizzazione del recettore transmembrana Fas/CD95/Apo1 mediante interazione con i domini DD (*death domain*). Il recettore attivato recluta una molecola citosolica adattatrice FADD (*Fas-Associated Death Domain*) e la procaspasi-8 attraverso interazione con un dominio DED (*death-effector domain*). Queste proteine formano un complesso detto DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*).

L'attivazione di caspasi-8 avviene mediante taglio proteolitico e innesca una cascata attivatoria che coinvolge la caspasi-10 e le caspasi -3,-7,-6 che, a loro volta sono in grado di agire su specifici substrati cellulari.

La caspasi-8 è inoltre legata alla via intrinseca apoptotica (generalmente indotta da stress e attivata da caspasi-9) attraverso due meccanismi: la scissione proteolitica della molecola Bid e la sintesi di ceramidi indotta dall'attivazione di sfingomielinasi acide/neutre.

I frammenti di Bid e ceramide, traslocando sulla membrana esterna del mitocondrio, interagiscono con BAX (*BCL-2 associated protein X*) e BAK (*BCL-2 antagonist/killer*). La oligomerizzazione di queste proteine stimola il rilascio di citocromo-c nel citoplasma che, legandosi ad Apaf-1 (*Apoptosis Protease Activating Factor-1*) e procaspasi-9, porta alla formazione di un complesso noto come apoptosoma. In seguito a taglio proteolitico, la caspasi-9 assume una conformazione attiva capace di processare altre caspasi nelle vicinanze: si innesca una cascata di trasduzione del segnale apoptotico che coinvolge le diverse caspasi effettrici e termina nell'idrolisi di substrati citosolici e nucleari.

In condizioni di stress moderato (carenza di fattori trofici) le cellule ricorrono a risorse alternative per mantenere la sopravvivenza cellulare (autofagia): le cellule sequestrano proteine e organelli invecchiati per riciclare le diverse parti e assicurarsi la sintesi di enzimi e componenti necessari alla sopravvivenza. Tuttavia, una prolungata condizione di stress o un mancato controllo della regolazione dell'autofagia possono condurre alla "morte cellulare autofagica", indipendente dalle caspasi.

## **CITOTOSSICITÀ CELLULO-MEDIATA E MECCANISMO DI ESOCITOSI DEI GRANULI CITOTOSSICI**

La citotossicità cellulo-mediata ha lo scopo di eliminare i patogeni intracellulari ed è inoltre in grado di riconoscere ed eliminare cellule che hanno modificazioni genetiche (es. espressione di antigeni anomali) come le cellule tumorali, cellule che hanno subito uno stress come l'alta temperatura e cellule allogene. Alla risposta cellulo-mediata partecipano sia cellule antigene-specifiche, come i linfociti T citotossici (CTL) CD8+ e i linfociti T helper (Th) CD4+, sia cellule non specifiche, come le cellule natural killer (NK).

L'attività citotossica dei CTL si esplica in seguito alla loro attivazione che richiede diversi segnali:

- un segnale è mediato dal TCR che riconosce antigeni specifici in complesso con molecole MHC di classe I espresse sulle APC
- un segnale costimolatorio fornito dall'interazione CD28-B7 presenti rispettivamente sul precursore del CTL e sulla APC
- un segnale fornito dall'interazione tra IL2 e il recettore per IL2 ad alta affinità che induce la proliferazione e il differenziamento dei precursori dei CTL attivati dall'antigene in CTL effettori.

L'uccisione delle cellule bersaglio da parte dei CTL avviene attraverso due meccanismi:

- rilascio di perforina/granzimi dai granuli citotossici
- interazione dei recettori di membrana Fas/Fas ligando.

Entrambi questi meccanismi portano all'induzione di un programma di morte cellulare della cellula bersaglio.

La citotossicità mediata dalle cellule NK è simile a quella dei CTL: esprimono Fas ligando sulla superficie inducendo la morte di cellule che esprimono Fas e possiedono numerosi granuli contenenti perforina e granzimi. Tuttavia l'attività citotossica delle cellule NK è costitutivamente attiva in quanto presentano sempre i granuli citotossici nel citoplasma, mentre i linfociti T CD8+ vergini, in seguito al riconoscimento antigenico, necessitano di 5-8 giorni per differenziare in CTL e durante questo processo granzimi e perforina sono sintetizzati e immagazzinati nei granuli citotossici.

Il legame del linfocita CTL o della cellula NK alla cellula bersaglio conduce alla formazione di una struttura detta sinapsi immunologica, mediante una riorganizzazione che coinvolge proteine di superficie, di segnalazione intracellulare e proteine del citoscheletro.

I linfociti CTL riconoscono con il TCR l'antigene presentato dalle molecole MHC sulla cellula bersaglio, con la quale interagiscono in modo transiente. I linfociti CTL orientano il MTOC (*microtubule-organization centre*) e l'intero sistema dei microtubuli nel sito di contatto cellula-cellula, dove viene organizzata la sinapsi immunologica. Per stabilizzare questa interazione si verifica un riarrangiamento delle molecole di membrana che porta alla formazione di due aree concentriche: cSMAC (*central supramolecular activation complex*) al centro, dove sono localizzati i TCRs e le molecole coinvolte nella segnalazione, circondato da pSMAC (*periferal SMAC*) che costituisce un anello di molecole di adesione ricco di integrine e proteine di membrana associate al citoscheletro che stabilizzano le interazioni cellula-cellula.

Il trasporto dei granuli secretori nella sinapsi immunologica è strettamente dipendente dai microtubuli del citoscheletro ai quali sono ancorati.

I granuli citotossici sono strutture multi vescicolari che originano dalla progressiva invaginazione della membrana plasmatica di endosomi primari, che successivamente maturano in endosomi tardivi e si fondono con i lisosomi. Le proteine secretorie (perforina e granzimi) sono localizzate in un denso dominio centrale, mentre le proteine lisosomiali solubili e associate alla membrana sono contenute nel dominio corticale.

In seguito alla polarizzazione del MTOC verso il sito di contatto CTL-cellula bersaglio, i granuli citotossici vengono inizialmente condotti alla pSMAC ricca di integrine, dove sono ancorati i microtubuli e successivamente si muovono nel dominio secretorio delle cSMAC per l'esocitosi. Questi eventi (polarizzazione del MTOC e trasporto dei granuli verso la sinapsi immunologica) sono stati innescati dalla stimolazione del TCR mediante vie di segnalazione che portano

all'attivazione della fosfolipasi C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), con produzione di diacilglicerolo e fosforilazione di ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) e altri eventi a valle. La produzione di inositolo-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) da parte della PLC $\gamma$  conduce alla mobilitazione del Ca<sup>2+</sup> intracellulare con un conseguente aumento del Ca<sup>2+</sup> citoplasmatico. La polarizzazione del MTOC è mediata da diacilglicerolo (DAG) in modo Ca<sup>2+</sup>-indipendente, mentre il trasporto dei granuli citotossici è mediata da Ca<sup>2+</sup>.

I granuli citotossici sono così localizzati nella sinapsi immunologica, ma prima dell'esocitosi le vescicole secretorie devono essere reclutate e ancorate alla membrana plasmatica, devono essere attivate (*priming*) prima del processo di fusione e infine avviene la fusione con la membrana plasmatica e il rilascio del loro contenuto.

L'ancoraggio della vescicola secretoria coinvolge la proteina RAB27a, appartenente alla famiglia delle proteine Rab, piccole GTPasi che regolano il traffico e la compartimentalizzazione delle vescicole.

RAB27a interagisce con SLP1 o SLP2 (*synaptotagmin-like protein*), le quali permettono il legame con la proteina di membrana SNAP23 (*synaptosomal-associated protein of 23 KDa*). I granuli secretori interagiscono così con il complesso di ancoraggio costituito dalle proteine MUNC18-2 e syntaxina 11 in conformazione inattiva.

Per rendere le vescicole secretorie competenti al processo di fusione con la membrana plasmatica è necessaria una fase di attivazione (*priming*) delle vescicole, mediata dalla proteina MUNC13-4. Essa promuove il cambiamento conformazionale del complesso syntaxina 11/MUNC18-2 nella forma attiva, probabilmente regolando l'interazione tra le proteine SNARE (*N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) espresse sulla membrana delle vescicole (vSNARE) e le proteine SNARE espresse sulla membrana plasmatica (t-SNARE), importanti nel processo di fusione.

Inoltre MUNC13-4 media l'associazione degli endosomi riciclatori (attraverso RAB11) con gli endosomi tardivi (attraverso RAB7) per formare vescicole esocitiche specializzate nella regolazione della via secretoria. Queste vescicole trasportano proteine effettorie del macchinario esocitico, come MUNC13-4, RAB27a e SLP-2. In seguito alla stimolazione con TCR, queste vescicole si fondono con i granuli contenenti perforina e si legano attraverso il dominio C2 delle proteine della famiglia SLP (SLP1 e SLP2) alla membrana plasmatica.

Successivamente si forma una struttura a fascio detta complesso SNARE tra le vSNARE, VAMP7 e/o VAMP8 (*vesicle-associated membrane protein 7*) da una parte e tSNARE, syntaxina 11 e SNAP23 dall'altra.

Il completamento della fusione avviene quando MUNC18-2 interagisce con il complesso SNARE.

Il contenuto delle vescicole secretorie, perforina e granzimi (serino-proteasi proapoptoriche), viene così rilasciato a contatto con la membrana della cellula bersaglio, insieme ad altre molecole quali granulosina e chemochine.

Perforina è una proteina di circa 67 KDa dotata di attività membranolitica. Quando i monomeri di perforina entrano a contatto con la membrana plasmatica della cellula bersaglio, subiscono un cambiamento conformazionale con esposizione di un dominio anfipatico che è in grado di inserirsi nella membrana. Qui, in presenza di  $Ca^{2+}$  i monomeri di perforina polimerizzano e formano un poro cilindrico che permette l'entrata dei granzimi nel citoplasma della cellula bersaglio.

Inoltre molte cellule esprimono il recettore del mannosio-6-fosfato (MPR) che è in grado di legare il granzima B e internalizzarlo mediante un meccanismo di endocitosi mediata da recettore.

I granzimi sono coinvolti nell'induzione della morte delle cellule bersaglio mediante meccanismi caspasi dipendenti e/o caspasi indipendenti.

Sono state identificate mutazioni a carico di geni che codificano per proteine coinvolte nella via di secrezione dei granuli citotossici che portano all'insorgenza di diversi disordini linfoproliferativi, tra i quali la linfoistiocitosi emofagocitica familiare (FHL). Si tratta di una malattia autosomica recessiva, colpisce circa 1/50000 nati e insorge nel primo anno di vita. È caratterizzata da una massiva attivazione macrofagica (detta anche linfoistiocitosi). Inoltre l'attività citotossica dei CTL e delle cellule NK è severamente ridotta. Si verificano risposte immunitarie incontrollate che comportano infiltrazione e danno tissutale ad opera dei macrofagi attivati e dei CTL, a causa del deficit dei meccanismi di innesco dell'apoptosi. Queste cellule sono spesso presenti nel midollo osseo, nella milza, nei linfonodi, nel fegato, nel sistema nervoso centrale, ma anche in altri organi. La malattia è caratterizzata da febbre, epatosplenomegalia, citopenia e disordini del sistema nervoso centrale.

È stato dimostrato che mutazioni a carico del gene PRF1 che codifica per la proteina perforina conducono alla sindrome FHL di tipo 2 (FHL2). Queste mutazioni determinano un difetto nel ripiegamento della proteina o nel processo di secrezione dei granuli che impediscono il processo di esocitosi.

La FHL di tipo 3 (FHL) è invece caratterizzata dalla presenza di mutazioni nel gene UNC13D che codifica per la proteina MUNC13-4, responsabile del *priming* delle vescicole secretorie prima della loro fusione con la membrana plasmatica. Questo deficit porta a una minore secrezione di perforina. Difetti nella proteina syntaxina-11 sono caratteristici della FHL di tipo 4 (FHL4), mentre MUNC18-2 è coinvolto nella FHL di tipo 5 (FHL5).

## **IL GENE UNC13D**

Il gene UNC13D si trova sul cromosoma 17q25, è costituito da 32 esoni (17 Kb) e codifica per una proteina di 1090 amminoacidi (150 KDa), denominata MUNC13-4.

MUNC13-4 è l'ultima proteina della famiglia MUNC13 ad essere stata identificata.

A questa famiglia appartengono anche MUNC13-1, MUNC13-2 e MUNC13-3. L'isoforma MUNC13-2 è espressa in modo ubiquitario nell'organismo, mentre

MUNC13-1 e MUNC13-3 sono espresse nel sistema nervoso centrale: MUNC13-1 è espresso nei neuroni e svolge un ruolo nell'attivazione delle vescicole sinaitiche, mentre MUNC13-3 è espresso nella regione del cervelletto e controlla il rilascio dei neurotrasmettitori.

La proteina MUNC13-4 è espressa nelle cellule della linea ematopoietica (CTL, cellule NK, piastrine), nei bronchi, nella milza, nelle cellule dell'apparato riproduttore, nei linfociti CTL e in misura minore, in altri tessuti come quello muscolare scheletrico e cardiaco, fegato, rene e cervello. (Koch H. *et al.*, 2000).

La proteina MUNC13-4 possiede quattro domini funzionali: due domini MHD (*Munc13-homology-domains*), necessari per la localizzazione alla vescicola, e due domini C2, che legano Ca<sup>2+</sup> e fosfolipidi. Le altre proteine della famiglia MUNC-13 possiedono anche un dominio C1 che lega l'estere del forbolo.

Tutte le proteine della famiglia MUNC13 sono coinvolte nella secrezione delle vescicole. In particolare MUNC13-4 interviene sulla regolazione delle vescicole ancorate alla membrana plasmatica, rendendole competenti per la fusione (*priming*). Nello specifico promuove l'attivazione del complesso syntaxina11/MUNC18-2 coinvolto nell'ancoraggio, probabilmente regolando l'interazione delle proteine vSNARE e tSNARE, importanti per il processo di fusione. MUNC13-4 è inoltre coinvolta nella regolazione delle vescicole secretorie, partecipando all'associazione degli endosomi riciclatori con gli endosomi tardivi (de Saint-Basile G. *et al.*, 2010).

Mutazioni di MUNC13-4 sono alla base della linfoistocitosi emofagocitica familiare (FHL) di tipo 3, malattia autoimmune linfoproliferativa caratterizzata da manifestazioni sistemiche eterogenee (febbre, epatosplenomegalia, citopenia, coagulazione anormale, disfunzioni epatiche e emofagocitosi). Le mutazioni causano una perdita della funzione della proteina, che impedisce l'esocitosi dei granuli citotossici contenenti perforina e granzimi, durante le fasi che coinvolgono la sinapsi immunologica. In particolare i pazienti affetti da FHL mostrano un normale ancoraggio delle vescicole alla membrana plasmatica, ma presentano un difetto nella fusione e nel rilascio del loro contenuto (Feldmann J. *et al.*, 2003. Rudd E. *et al.*, 2008).

## **SCOPO DEL LAVORO:**

La regolazione della risposta immunitaria, mediante citotossicità cellulo-mediata, è un evento fondamentale per l'omeostasi del sistema immunitario. La ridotta funzionalità o l'assenza di proteine coinvolte in queste vie di segnalazione predispone allo sviluppo di malattie autoimmuni.

La “sindrome autoimmune proliferativa” (ALPS) è caratterizzata dalla presenza di difetti genetici che portano a una compromessa funzione del recettore Fas. La malattia è caratterizzata da manifestazioni autoimmuni e linfoproliferazione che dipendono dall'accumulo di linfociti negli organi linfoidi secondari e dall'espansione di cellule T CD4- CD8- (DN).

Nel laboratorio di Immunologia del prof. U. Dianzani sono stati identificati pazienti con un quadro clinico simile ai pazienti affetti da ALPS, ma privi dell'espansione dei linfociti DN necessari per la diagnosi di ALPS. Questa forma incompleta di ALPS è stata denominata DALD (malattia autoimmune linfoproliferativa di Dianzani) ed è anch'essa caratterizzata da difetti nel programma apoptotico derivati da una difettiva funzione di Fas.

Un'altra malattia linfoproliferativa è la linfoistiocitosi emofagocitica familiare (FHL) di cui esistono diversi sottotipi. È stato dimostrato che mutazioni a carico del gene PRF1 che codifica per la proteina perforina, proteina presente nei granuli citotossici, conducono alla sindrome FHL di tipo 2 (FHL2), mentre mutazioni nel gene UNC13D che codifica per la proteina MUNC13-4, responsabile del *priming* delle vescicole secretorie prima della loro fusione con la membrana plasmatica, sono state riscontrate in pazienti affetti dalla sindrome FHL di tipo 3. Entrambe queste malattie sono caratterizzate da un deficit di perforina, che porta a una mancata induzione del meccanismo apoptotico da parte delle cellule citotossiche che falliscono nella loro funzione di immunosorveglianza. In un contesto di linfoistiocitosi, ovvero intensa attivazione macrofagica che si osserva nella malattia, la ridotta attività delle cellule citotossiche favorisce l'infiltrazione dei macrofagi attivati che causa danno tissutale.

Uno studio condotto dal laboratorio di Immunologia del prof. U. Dianzani ha dimostrato che variazioni presenti nel gene PRF1 possono favorire lo sviluppo di ALPS/DALD, soggetti che presentano una compromessa funzione di Fas.

Inoltre in pazienti affetti da ALPS/ DALD sono state recentemente identificate delle variazioni nel gene UNC13D che conferiscono un fattore di rischio per le suddette malattie. In particolare la regione codificante del gene è stata sequenziata in 22 pazienti affetti da ALPS e 20 pazienti affetti da DALD e sono state identificate 8 variazioni missenso presenti in eterozigosi in 9 pazienti (6 ALPS e 3 DALD). Di queste variazioni 3 (A59T, R928C e R928P) sono state precedentemente

descritte anche in pazienti FHL, mentre le altre (C112S, V781I, I848L, S923C e A995P) non sono mai state descritte (dati non pubblicati).

In tutte queste malattie linfoproliferative si osservano mutazioni o variazioni in geni che codificano per proteine coinvolte nella citotossicità cellulo-mediata, più precisamente che compromettono l'induzione del programma apoptotico (Fas) o la secrezione dei granuli citotossici (MUNC13-4 e perforina) in differenti modi.

Nonostante l'eterogeneità delle mutazioni e delle variazioni riscontrate e del loro effetto finale sulle proteine codificate, si va delineando un meccanismo comune che potrebbe essere presente anche in altre malattie autoimmuni.

Quindi sulla base di queste osservazioni e sulla base del fatto che pazienti affetti da sclerosi multipla e diabete di tipo 1 presentano anch'essi difetti nella funzionalità di Fas e variazioni nel gene PRF1 che conferiscono suscettibilità per lo sviluppo delle suddette malattie autoimmuni, abbiamo voluto indagare se la proteina MUNC13-4, che partecipa al meccanismo di secrezione dei granuli citotossici, potesse avere un ruolo anche in queste malattie autoimmuni più frequenti nella popolazione generale.

A questo scopo, durante la mia attività di laboratorio, mi sono occupata di analizzare la porzione codificante del gene UNC13D in pazienti affetti da sclerosi multipla e diabete mellito di tipo 1, mediante sequenziamento automatico.

# MATERIALI E METODI

## PAZIENTI

Per effettuare questo studio sono stati analizzati 42 pazienti affetti da sclerosi multipla e 27 pazienti affetti da diabete mellito confrontati con 39 soggetti sani etnicamente correlati, utilizzati come controlli. I prelievi di sangue periferico sono stati ottenuti dai pazienti e dai controlli previo consenso informato. Lo studio è stato condotto seguendo le linee guida del comitato etico locale.

## ESTRAZIONE DI DNA DA SANGUE

Il DNA utilizzato nello studio è stato estratto da campioni di sangue intero eparinato, prelevato dai pazienti o dai soggetti sani. I campioni sono stati sottoposti a lavaggio con aggiunta di una soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) in rapporto 1:2 con il sangue stesso e sono stati centrifugati a 2500 rpm per 20 minuti per eliminare il surnatante. Il lavaggio è stato ripetuto per due volte. In seguito è stato aggiunto il tampone di emolisi (5 mM MgCl<sub>2</sub> esaidrato, 10% NP40) e i campioni sono stati mantenuti in agitazione a temperatura ambiente per 10-15 minuti. I campioni vengono centrifugati a 2500 rpm per 20 minuti. Per rimuovere eventuali residui derivati dall'emolisi è stato effettuato un ulteriore lavaggio con soluzione fisiologica, centrifugando 10 minuti a 1500 rpm. Successivamente è stato aggiunto il tampone di lisi (10 mM TRIS pH 8,2, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA), SDS 20% (25µL ogni mL di tampone di lisi) e proteinasi K (20 mg/mL ovvero 25 µL per ogni mL di tampone di lisi). I campioni sono stati incubati a 37°C in agitazione per 16 ore. La precipitazione delle proteine, cosiddetta "*salting-out*" è stata effettuata con l'aggiunta di una soluzione di NaCl 6 M. Le proteine precipitate sono state rimosse mediante centrifugazione a 2500 rpm per 20 minuti. Il surnatante è stato recuperato in nuove provette a cui è stato aggiunto un uguale volume di etanolo per la precipitazione del DNA. Il campione è stato mantenuto in agitazione per 10-15 minuti per favorire la precipitazione del DNA, visibile ad occhio nudo. Il DNA è stato prelevato, avendo cura di non frammentarlo, ed è stato lavato con etanolo 70% . Infine il DNA è stato risospeso in TE (10 mM TRIS-HCl pH 7,5 e 1 mM EDTA pH 8). Se durante la fase di recupero, il DNA non è visibile, è possibile far precipitare il DNA mediante ultracentrifugazione: è stato aggiunto etanolo (in rapporto 1:2 rispetto all'etanolo precedentemente utilizzato) e acetato di sodio 3 M (in rapporto 1:10 sul volume totale). Il campione è stato mantenuto a -80°C per due ore. A questo punto è stato centrifugato per 11000 rpm per 45 minuti a 4°C. Successivamente è stato eliminato il surnatante e il DNA depositato sul fondo del tubo è stato risospeso in TE.

## QUANTIFICAZIONE SPETTROFOTOMETRICA DEL DNA

La concentrazione di DNA estratto è stata determinata tramite lettura spettrofotometrica con lo strumento Nanodrop<sup>TM</sup> 2000c (THERMO Scientific).

### PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

La regione codificante del gene UNC13D comprende 32 esoni che sono stati amplificati a partire da campioni di DNA genomico estratto da pazienti affetti da sclerosi multipla e diabete mellito e da controlli sani, mediante la tecnica della PCR. Sono stati utilizzati diversi *primers* (Sigma) in modo tale da amplificare gruppi comprendenti più esoni. La tabella sottostante riassume le condizioni di amplificazione ottimizzate per ciascun gruppo.

Esoni	Primers	T <sub>m</sub>	T <sub>a</sub>	[MgCl <sub>2</sub> ]	amplificato
1	<b>1F:</b> 5'-gcataatcctgtggcttcgc-3'	62°C	60°C	1 mM	237 bp
	<b>1R:</b> 5'-gagaccacagtgtcccca-3'	64°C			
2-3	<b>2F2:</b> 5'-acccttggcctggatcaggc-3'	66°C	62°C	1,5mM	591 bp
	<b>3R2:</b> 5'-tgaccgctgcagtgctgc-3'	66°C			
4-5	<b>4F2:</b> 5'-cctctgagctgctgcgatac-3'	64°C	62°C	1,5mM	435 bp
	<b>5F2:</b> 5'-ggcttcttggagtggtgc-3'	64°C			
6	<b>6F2:</b> 5'-gcaccactccaagaagcc-3'	64°C	TD 65-55°C	1 mM	392 bp
	<b>6R2:</b> 5'-tgctaccaggaagacctg-3'	62°C			
7-8-9-10	<b>7F:</b> 5'-gctacaactccatggctctg-3'	62°C	63°C	2 mM	924 bp
	<b>10R:</b> 5'-gcagaccgcccaagagct-3'	68°C			
10-11-12	<b>10F2:</b> 5'-gctctgtgtcctcacaagc-3'	62°C	60°C	1,5 mM	678 bp
	<b>12R2:</b> 5'-ctccaagccgtagccaaa-3'	62°C			
13-14	<b>13F2:</b> 5'-gaacaggggaaggcaattcc-3'	64°C	62°C	1,5 mM	508 bp
	<b>14F2:</b> 5'-ccacctgcactactcctc-3'	64°C			
15-16-17	<b>15F2:</b> 5'-gaggagtgagtgagtgagg-3'	64°C	TD 65-55°C	1,5 mM	462 bp
	<b>17R2:</b> 5'-gtcaccagtgccatacacc-3'	64°C			
18-19-20	<b>18F2:</b> 5'-acaagtgagcagatagccagg-3'	64°C	TD 65-55°C	2 mM	680 bp
	<b>20R2:</b> 5'-ttggaggtccagcagaacc-3'	64°C			
21-22	<b>21F2:</b> 5'-gctgctctatgaatgaaggaag-3'	64°C	TD 65-55°C	2 mM	568 bp
	<b>22R2:</b> 5'-gagatgcagagcttctgaac-3'	64°C			
23-24	<b>23F2:</b> 5'-aagcccaggcagccaacatg-3'	64°C	62°C	1,5 mM	629 bp
	<b>24R2:</b> 5'-ttcaatgacccagatctacag-3'	64°C			
25	<b>25F2:</b> 5'-actacaactgctctcacag-3'	58°C	TD 65-55°C	1 mM	271 bp
	<b>25R2:</b> 5'-caggaaggagggccgt-3'	58°C			
26-27	<b>26F2:</b> 5'-cctttctcaagagcgtcttg-3'	62°C	TD 65-55°C	2,5 mM	392 bp
	<b>27R2:</b> 5'-gtgagtgccaaaaggcaggc-3'	64°C			
28-29-30	<b>28F2:</b> 5'-ttgacagtgagctctggagg-3'	66°C	60°C	1 mM	775 bp
	<b>30R2:</b> 5'-gggagcccagtgaggagag-3'	66°C			
31-32	<b>31F:</b> 5'-agtgggtgaacccatgtcc-3'	64°C	60°C	1,5 mM	1150 bp
	<b>32R:</b> 5'-caggaaagcccttgaagtc-3'	62°C			

**Tabella 1:** Condizioni di amplificazione dei diversi esoni: primer forward (F) e reverse(R), seguiti dalla sequenza di appaiamento (5'→3'), T<sub>m</sub>: temperatura di Melting, T<sub>a</sub>: temperatura di annealing, TD: touch down, [MgCl<sub>2</sub>]: concentrazione di MgCl<sub>2</sub>, lunghezza del frammento amplificato.

La reazione di amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 25  $\mu$ L, utilizzando 100-200 ng/mL di DNA. La miscela di reazione è composta da  $MgCl_2$  (vedi *Tabella 1*), dal *buffer* di reazione contenente TRIS-HCl 200 mM a pH 8,4 e KCl 500 mM (Invitrogen), da una miscela 0,2 mM di dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen) e da 3,5 U/ $\mu$ L di *recombinant Taq DNA Polymerase* 5U/ $\mu$ L (Invitrogen).

Ogni reazione di PCR è composta dai seguenti cicli:

- denaturazione 95°C per 5'
  - denaturazione 95°C per 30''
  - appaiamento ( $T_a$  vedi *Tabella 1*) per 30''
  - allungamento 75°C per 45'' - 1'15'' \*
  - allungamento 75°C per 7'
- } 35 cicli

\* a seconda della lunghezza del frammento da amplificare

Per alcuni gruppi di esoni è stata effettuata una PCR di tipo *touch down* (TD), dove la temperatura di appaiamento ( $T_a$ ) viene fatta scendere di 2°C ogni 2 cicli, a partire da 65°C fino a 55°C.

Quest'ultima temperatura viene mantenuta per 25 cicli per terminare la reazione.

## ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

Per visualizzare il prodotto della PCR, è stata effettuata una elettroforesi su gel utilizzando un gel di agarosio 1% in tampone TAE (TRIS-acetato 40 mM pH8 ed EDTA ph 8), contenente GelRed 10000x (Biotium). Una piccola aliquota della reazione di PCR (3 $\mu$ L) è stata addizionata ad una soluzione contenente 50% vol/vol glicerolo e 0,1% Orange G (Sigma), per favorire il caricamento dei campioni nel gel. Sono stati inoltre utilizzati come riferimento i pesi molecolari *Gene Ruler 1 Kb DNA ladder* (Fermentas). L'esposizione ai raggi UV e la rilevazione della fluorescenza che permette la visualizzazione del DNA, è stata effettuata con lo strumento Gel Doc 1000 (Biorad).

## SEQUENZIAMENTO AUTOMATICO

I prodotti di PCR sono stati purificati dall'eccesso di *primers* e di nucleotidi utilizzando gli enzimi EXO (Esonucleasi I) e SAP I (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) (USB) tramite un ciclo di incubazione di 20 minuti a 37°C e uno di 20 minuti a 80°C.

Le reazioni per il sequenziamento sono state ottenute servendosi del kit specifico *ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystem), dotato di dideossinucleotidi marcati con differenti fluorocromi. Seguendo il protocollo fornito dalla ditta, per un volume finale di reazione di 10  $\mu$ l, sono stati addizionati al DNA purificato, 2  $\mu$ l di BigDye Sequencing Buffer (in dotazione con il kit) e il primer (3,2  $\mu$ M/ $\mu$ l) *forward* o *reverse*.

La reazione di sequenziamento prevede il seguente programma:

- denaturazione a 96°C per 1'
  - denaturazione a 96°C per 10''
  - appaiamento a 50°C per 5''
  - estensione a 60°C per 4'
- } 25 cicli

Il prodotto della reazione è stato ulteriormente purificato mediante il kit *Montage SEQ<sub>96</sub> Sequencing Reaction Cleanup* (Montage), seguendo le istruzioni della ditta produttrice. I campioni purificati sono stati addizionati alla formamide, sottoposti a denaturazione per 3 minuti a 95°C e sono stati successivamente caricati sulla piastra ottica per la successiva analisi al sequenziatore (*ABI PRISM 3100 Genetics Analyser*).

### **ANALISI STATISTICA**

L'analisi della frequenza di distribuzione degli alleli nelle popolazioni è stata eseguita applicando il test del  $\chi^2$ , utilizzando il software statistico StatCalc 1.1.

## RISULTATI

### ANALISI MEDIANTE SEQUENZIAMENTO AUTOMATICO DEL GENE UNC13D

Durante l'analisi delle sequenze del gene UNC13D sono state riscontrate 7 variazioni nucleotidiche (175G>A, 279C>T, 888G>C, 2599C>T, 2782C>T, 2943G>A, 3198>G), tutte precedentemente descritte in letteratura (vedi Tabella sottostante).

posizione nucleotidica*	SNP ID	localizzazione	Alleli
+175	rs9904366	esone 3	G/A
+279	rs3744007	esone 4	C/T
+888	rs7223416	esone 11	G/C
+2599	rs1135688	esone 27	A/G
+2782	rs35037984	esone 29	C/T
+2943	rs35628234	esone 30	G/A
+3198	rs7210574	esone 32	A/G

Tabella: Polimorfismi del gene UNC13D identificati nei controlli e nei pazienti affetti da SM e T1DM. (\* La posizione nucleotidica si riferisce al cDNA, dove +1 indica il codone di inizio ATG).

Tre delle variazioni nucleotidiche individuate (175G>A, 2599G>C, 2782C>T) sono di tipo *missence*, mentre le restanti non comportano modificazioni nella catena amminoacidica della proteina codificata. Nonostante sia un lavoro *in progress*, quindi al momento il sequenziamento dell'intero gene in tutti i suoi esoni non è stato completato (sia per quanto riguarda i controlli, sia per quanto riguarda i pazienti), per ogni variazione nucleotidica al momento riscontrata sono state calcolate le frequenze genotipiche ed alleliche. Le frequenze alleliche dei controlli sono state inoltre confrontate con quelle dei pazienti divisi nei due gruppi mediante il test del  $\chi^2$ , anche se in questa fase del lavoro non si raggiunge ancora la significatività statistica.

#### VARIAZIONE NUCLEOTIDICA 175G>A

La variazione nucleotidica situata in posizione +175 (rs9904366) corrisponde ad una sostituzione di una guanina in una adenina. Il codone GCA che codifica per un residuo di alanina viene modificato in ACA, che codifica per l'amminoacido treonina in posizione 59 sulla catena amminoacidica (A59T). Le popolazioni sono in equilibrio di Hardy-Weinberg.

	Esone 3 +175 rs9904366	CONTROLLI		SM		T1DM	
		numero	frequenze %	numero	frequenze %	numero	frequenze %
<b>GENOTIPO</b>	<b>GG</b>	26	93	31	91	31	97
	<b>GA</b>	2	7	3	9	1	3
<b>ALLELE</b>	<b>G</b>	54	96	65	96	63	98
	<b>A</b>	2	4	3	4	1	2
				ns		Ns	

Tabella: Frequenze genotipiche e alleliche della variazione nucleotidica 175G>A.

### VARIAZIONE NUCLEOTIDICA 279C>T

La variazione nucleotidica situata in posizione +279 (rs3744007) corrisponde ad una sostituzione di una citosina in una timina. Il codone CCC che codifica per un residuo di prolina viene modificato in CCT, che codifica per lo stesso amminoacido in posizione 93 sulla catena amminoacidica (P93P).

Le popolazioni sono in equilibrio di Hardy-Weinberg.

	esone 4 +279 rs3744007	CONTROLLI		SM		T1DM	
		numero	frequenze %	numero	frequenze %	numero	frequenze %
<b>GENOTIPO</b>	<b>CC</b>	25	89	38	93	23	88
	<b>CT</b>	3	11	3	7	3	12
<b>ALLELE</b>	<b>C</b>	53	95	79	96	49	94
	<b>T</b>	3	5	3	4	3	6
				ns		Ns	

Tabella: Frequenze genotipiche e alleliche della variazione nucleotidica 279C>T.

### VARIAZIONE NUCLEOTIDICA 888G>C

La variazione nucleotidica situata in posizione +888 (rs7223416) corrisponde ad una sostituzione di una guanina in una citosina. Il codone CCG che codifica per un residuo di prolina viene modificato in CCC, che codifica per lo stesso amminoacido in posizione 296 della catena amminoacidica (P296P). Le popolazioni non sono in equilibrio di Hardy-Weinberg.

esone 11 +888 rs7223416		CONTROLLI		SM		T1DM	
		numero	frequenze	numero	frequenze	numero	Frequenze
		%		%		%	
<b>GENOTIPO</b>	<b>GG</b>	20	65	20	51	9	45
	<b>GC</b>	6	19	15	38	7	35
	<b>CC</b>	5	16	4	10	4	20
<b>ALLELE</b>	<b>G</b>	46	74	55	71	25	63
	<b>C</b>	16	26	23	29	15	38
				ns		Ns	

Tabella: Frequenze genotipiche e alleliche della variazione nucleotidica 888G>C.

### VARIAZIONE NUCLEOTIDICA 2599A>G

La variazione nucleotidica situata in posizione +2599 (rs1135688) corrisponde ad una sostituzione di una adenina in una guanina. Il codone AAG che codifica per un residuo di lisina viene modificato in GAG, che codifica per un residuo di acido glutammico in posizione 867 della catena amminoacidica (K867E). Le popolazioni non sono in equilibrio di Hardy-Weinberg.

esone 27 +2599 rs1135688		CONTROLLI		SM		T1DM	
		numero	frequenze	numero	frequenze	numero	frequenze
		%		%		%	
<b>GENOTIPO</b>	<b>AA</b>	13	41	15	38	8	32
	<b>AG</b>	15	47	21	54	11	44
	<b>GG</b>	4	13	3	8	6	24
<b>ALLELE</b>	<b>A</b>	41	64	51	65	27	54
	<b>G</b>	23	36	27	35	23	46
				ns		Ns	

Tabella: Frequenze genotipiche e alleliche della variazione nucleotidica 2599>G.

### VARIAZIONE NUCLEOTIDICA 2782C>T

La variazione nucleotidica situata in posizione +2782 (rs35037984) corrisponde ad una sostituzione di una citosina in una timina. Il codone CGT che codifica per un residuo di arginina viene modificato in TGT, che codifica per un residuo di cisteina in posizione 928 della catena amminoacidica (R928C). Le popolazioni sono in equilibrio di Hardy-Weinberg.

esone 29 +2782 rs35037984		CONTROLLI		SM		T1DM	
		numero	frequenze %	numero	frequenze %	numero	frequenze %
<b>GENOTIPO</b>	<b>CC</b>	29	83	36	95	16	100
	<b>CT</b>	6	17	2	5	0	0
<b>ALLELE</b>	<b>C</b>	64	91	74	97	32	100
	<b>T</b>	6	9	2	3	0	0
				ns		Ns	

Tabella: Frequenze genotipiche e alleliche della variazione nucleotidica 2782C>T.

### VARIAZIONE NUCLEOTIDICA 2943G>A

La variazione nucleotidica situata in posizione +2943 (rs35628234) corrisponde ad una sostituzione di una guanina in una adenina.

Il codone GAG che codifica per un residuo di acido glutammico viene modificato in GAA, che codifica per lo stesso amminoacido in posizione 981 della catena amminoacidica (E981E). Le popolazioni sono in equilibrio di Hardy-Weinberg.

esone 30 +2943 rs35628234		CONTROLLI		SM		T1DM	
		numero	frequenze %	numero	frequenze %	numero	frequenze %
<b>GENOTIPO</b>	<b>GG</b>	32	91	36	95	8	100
	<b>GA</b>	3	9	2	5	0	0
<b>ALLELE</b>	<b>G</b>	67	96	74	97	16	100
	<b>A</b>	3	4	2	3	0	0
				ns		Ns	

Tabella: Frequenze genotipiche e alleliche della variazione nucleotidica 2933G>A.

### VARIAZIONE NUCLEOTIDICA 3198A>G

La variazione nucleotidica situata in posizione +3198 (rs7210574) corrisponde ad una sostituzione di una adenina in una guanina. Il codone GAA che codifica per un residuo di acido glutammico viene modificato in GAG, che codifica per lo stesso amminoacido in posizione 1066 della catena amminoacidica (E1066E). Le popolazioni non sono in equilibrio di Hardy-Weinberg.

esone 32 +3198 rs7210574		CONTROLLI		SM		T1DM	
		numero	frequenze	numero	frequenze	numero	frequenze
		%		%		%	
<b>GENOTIPO</b>	<b>AA</b>	9	36	15	39	5	26
	<b>AG</b>	12	48	16	42	9	47
	<b>GG</b>	4	16	7	18	5	26
<b>ALLELE</b>	<b>A</b>	30	60	46	61	19	50
	<b>G</b>	20	40	30	39	19	50
				ns		ns	

Tabella: Frequenze genotipiche e alleliche della variazione nucleotidica +3198A>G.

## DISCUSSIONE

Il gene UNC13D, costituito da 32 esoni, codifica per la proteina MUNC13-4, coinvolta nell'esocitosi dei granuli citotossici contenenti perforina e granzimi. In particolare MUNC13-4 rende competenti alla fusione le vescicole localizzate alla membrana plasmatica mediante l'attivazione del complesso syntaxina11/MUNC18-2.

Mutazioni del gene UNC13D che causano perdita di funzione della proteina sono responsabili della malattia linfoproliferativa FHL di tipo 3 (FHL3). Recentemente nel laboratorio di Immunologia del prof. U. Dianzani sono state identificate 5 nuove variazioni nucleotidiche nel gene UNC13D (335G>S, 2342G>A, 2542A>C, 2768C>G, 2983G>C) in pazienti affetti da ALPS/DALD. Si tratta di variazioni di tipo *missense* (rispettivamente C112S, V781I, I848L, S923C, A995) che sono state riscontrate in eterozigosi e queste variazioni costituiscono un fattore di rischio per lo sviluppo di ALPS e DALD (dati non pubblicati).

Queste malattie linfoproliferative (FHL, ALPS e DALD) inoltre presentano a vari livelli una difettiva funzione di Fas e perforina, che compromette ulteriormente la citotossicità cellulo-mediata. È stato dimostrato che pazienti affetti da sclerosi multipla e diabeto mellito di tipo 1 presentano una difettiva funzione di Fas e variazioni nel gene di perforina che conferiscono suscettibilità alle suddette malattie. Quindi, essendo note mutazioni e/o variazioni nel gene UNC13D in FHL, ALPS e DALD, abbiamo voluto indagare se il gene UNC13D potesse avere un ruolo anche in altre malattie autoimmuni più comuni come sclerosi multipla e diabete mellito di tipo 1.

Nella ricerca di mutazioni e/o variazioni del gene sono stati presi in considerazione 39 controlli sani, 42 pazienti affetti da SM e 27 pazienti affetti da T1DM.

Al momento non è stato possibile completare il sequenziamento del gene UNC13D in tutti i soggetti inclusi nella casistica. Si tratta di uno studio in fase iniziale e tuttora in svolgimento, quindi i dati mostrati in questa tesi sono incompleti. Malgrado la maggior parte delle popolazioni prese in considerazione rispettino l'equilibrio di Hardy-Weinberg e quindi è possibile fare un confronto tra i dati ottenuti, essi non raggiungono la significatività statistica.

Dall'analisi emersa finora sono state rilevate variazioni nucleotidiche già osservate e documentate in letteratura. L'analisi delle frequenze alleliche tra controlli e pazienti (SM e T1DM) non sembra evidenziare delle differenze anche se non in modo statisticamente significativo.

Inoltre non sono state riscontrate nuove mutazioni e/o variazioni nucleotidiche.

Tuttavia non è possibile escludere la presenza di mutazioni e/o variazioni nei pazienti non ancora analizzati o in cui il sequenziamento completo del gene non è stato effettuato.

Nonostante l'ottimizzazione del protocollo di amplificazione di gruppi di esoni del gene UNC13D, il suo sequenziamento completo richiede ancora molti sforzi. Si tratta di un gene piuttosto lungo (32 esoni per una lunghezza di circa 17 kb), particolarmente ricco di GC.

Sulla base dei dati finora ottenuti, non possiamo escludere un coinvolgimento del gene UNC13D nella sclerosi multipla e nel diabete mellito di tipo 1. L'obiettivo futuro è quello di completare ed eventualmente implementare questa analisi aumentando il numero dei soggetti analizzati, sia per quanto riguarda i controlli, sia per quanto riguarda i pazienti.

La popolazione analizzata è al momento troppo piccola per poter trarre delle conclusioni su malattie autoimmuni "frequenti" come SM e T1DM. Inoltre per quanto riguarda la sclerosi multipla sono stati analizzati pazienti con la malattia in forma recidivante-remittente (RRSM) e quindi potrebbe essere interessante introdurre nello studio pazienti con forme progressive della malattia, più rare e spesso refrattarie alle terapie.

**SEMINARI INTERNI AL DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E  
SPERIMENTALE E AL DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE  
A.A. 2010 – 2011 :**

- 29 novembre 2010

***Le cellule NK: dalla biologia alla terapia di leucemie ad alto rischio***

Prof. Lorenzo MORETTA

- 1 dicembre 2010

***Targeting Lactate-fueled respiration in cancer: a new therapeutic opportunity?***

Prof. Pierre SONVEAUX

- 17 febbraio 2011

***Human papillomavirus infection and other risk factors for skin cancer in organ transplant recipients***

Prof. J. N. Bouwes BAVINCK

- 2 marzo 2011

***Linfomi Cutanei Primitivi***

Prof. Emilio BERTI

- 24 marzo 2011

***The role of the HPV E6 oncoprotein in malignant progression***

Dr. Lawrence BANKS

- 12 aprile 2011

***Ferritins: ancient proteins with novel unexpected features***

Dr. Sonia LEVI

- 13 aprile 2011

***Metabolic syndrome: the gastroenterologist point of view***

Elisabetta BUGGIANESI

- 14 aprile 2011

***Nanotecnologie applicate alla medicina: le nuove frontiere della nano medicina***

Prof. Gianfranco PELUSO

- 29 aprile 2011

***Liver fibrosis in children affected by NASH: how to investigate that***

Valerio NOBILI

- 9 maggio 2011

***Innate Immunity and the pathogenicity of inhaled microbial particles***

Henrik WOLFF

- 12 maggio 2011

***Endocrine disturbances during tyrosine kinase inhibitor treatment***

Prof. Roberto BALDELLI

- 13 maggio 2011

***Farmacologia dell'aterosclerosi***

Alberto CORSINI

- 19 maggio 2011

***Mechanisms and Models of TDP-43 Proteinopathies***

Prof. Leonard PETRUCELLI

- 25 maggio 2011

***Iron management in the Hcpidin Hera***

Dr. Steven R. ELLIS

- 17 giugno 2011

***Molecular pathogenesis and biomarkers of Parkinson's disease***

Prof. Mauro FASANO

- 24 giugno 2011

***Frontotemporal Dementia: trying to solve a complex disorders***

Dr. Jonathan D. Roher

- 1 luglio 2011

***Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis***

Prof. Maurizio PAROLA

### **ATTIVITÀ FORMATIVA SVOLTA:**

Seminari sulle malattie degenerative interni al dipartimento di Scienze Mediche e di Medicina Clinica e Sperimentale

Modulo 1: introduzione alle malattie degenerative sistemiche tenute dal Prof. Emanuele ALBANO

- 4 marzo 2011
- 11 marzo 2011

Modulo 2: introduzione alle malattie neurodegenerative

- 25 marzo 2011 ***Sclerosi laterale amiotrofica*** Prof. Lucia CORRADO
- 1 aprile 2011 ***Parkinson e Alzheimer*** Prof. Cristoforo COMI

Journal Club interni ai dipartimenti

### **PARTECIPAZIONE A CONGRESSI:**

- congresso nazionale:

***CRNI, corsi residenziali di neuro immunologia – malattie neurodegenerative e psichiatriche: nuove frontiere della neuro immunologia***

16-19 marzo 2011 (Bergamo, Italia)