

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



**Analisi del gene H4/ICOS nei
pazienti con Sclerosi Multipla**

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

**Relazione II⁰ anno
Candidato: Castelli Luca**

INTRODUZIONE

H4/ICOS

Il gene e la molecola

H4 è una molecola originariamente identificata nel nostro laboratorio ed espressa in membrana dai linfociti T umani e murini attivati (1-2). Successivamente è stato descritto il clonaggio di una molecola espressa selettivamente dai linfociti T attivati e correlata strutturalmente e funzionalmente a CD28 denominata ICOS (Inducible T cell Costimulator) (3). Il nostro laboratorio ha dimostrato che H4 e ICOS sono in realtà la stessa molecola (4).

Il gene che codifica per ICOS mappa nella regione cromosomica 2q33 insieme ai geni per CD28 e CTLA-4; questi tre geni sono funzionalmente correlati e appartengono alla famiglia molecolare di CD28 con il quale ICOS ha un'identità di sequenza aminoacidica di circa il 19% nel topo e di circa il 24% nell'uomo e una similarità di sequenza di circa il 39% nell'uomo (3). Il gene ICOS è polimorfico ed è costituito da 5 esoni e 4 introni e si estende per una regione di circa 24 kb. Gli esoni 1, 2 e 3 codificano rispettivamente per la sequenza leader, il dominio extracellulare e il dominio transmembrana, mentre gli esoni 4 e 5 codificano per il dominio intracellulare (27).

La proteina ICOS è una molecola transmembrana di tipo I costituita da 199 aminoacidi ed espressa sotto forma di monomero oppure di omodimero; la forma dimerica ha un peso molecolare di circa 55-60 kDa mentre ogni singola catena pesa circa 27-29 kDa (3).

ICOS nell'attivazione dei linfociti T

I linfociti T rappresentano un importante componente cellulare del sistema immunitario e sono caratterizzati dall'espressione in membrana del TCR (T Cell Receptor) e dei corecettori CD4 e CD8. Il TCR rappresenta il recettore per l'antigene dei linfociti T maturi ed è costituito dall'associazione di 2 catene polipeptidiche denominate α e β (o meno frequentemente γ e δ) unite tra loro da ponti disolfuro. Le code intracellulari delle due catene del TCR sono troppo corte per poter svolgere la funzione di trasduzione del segnale; questa funzione viene infatti svolta da un complesso molecolare transmembrana associato al TCR e definito complesso del CD3 e costituito dalle catene γ , δ , ϵ . Il TCR non riconosce l'antigene libero in soluzione, ma solo legato a particolari molecole denominate MHC (Major Hystocompatibility Complex); le molecole MHC sono espresse in membrana da cellule che hanno la funzione di presentare l'antigene ai linfociti T definite APC (Antigen Presenting Cell) e sono rappresentate da linfociti B, cellule dendritiche e macrofagi. Le molecole MHC sono poligeniche ed estremamente polimorfiche, due fenomeni comprensibili dato

che una singola molecola MHC lega specificamente un singolo antigene, quindi maggiore è il numero di MHC differenti e maggiore sarà il numero di diversi antigeni che potranno essere legati e presentati ai linfociti T. Inoltre le molecole MHC si distinguono in base al tipo di antigene che legano e riconoscono:

- Le molecole di classe I legano peptidi che derivano da proteine citosoliche e sono riconosciute dai corecettori CD8 espressi sulla membrana del linfocita T
- Le molecole di classe II legano peptidi che derivano da proteine extracellulari endocitate e degradate all'interno di appositi organuli intracellulari e sono riconosciute dai corecettori CD4 espressi sulla membrana dei linfociti T.

I corecettori CD4 e CD8 favoriscono il contatto tra cellule T e cellule APC grazie al loro legame con regioni non polimorfiche delle molecole MHC. I corecettori hanno inoltre due altre importanti funzioni:

- la prima è quella di partecipare agli eventi precoci della trasduzione del segnale che si verifica in seguito al riconoscimento del complesso antigene-MHC da parte del linfocita T; questa funzione è resa possibile dall'associazione della tirosina-kinasi lck con le code citoplasmatiche dei corecettori
- la seconda è quella di essere responsabile del fenomeno della restrizione per MHC in virtù del riconoscimento specifico che si ha tra CD4 e i complessi antigene-MHC II e tra CD8 e i complessi antigene-MHC I

L'attivazione dei linfociti T richiede due distinti segnali, uno costituito dal legame del complesso antigene-MHC espresso dalle cellule APC con il TCR del linfocita T e l'altro costituito dal legame delle molecole costimolatorie espresse sulla superficie delle cellule APC con specifici recettori espressi dai linfociti T. Il ruolo delle molecole costimolatorie è essenziale in quanto il segnale uno (legame complesso antigene-MHC con il TCR del linfocita T) in assenza del segnale due (costimolazione) non attiva i linfociti T ma induce uno stato di anergia clonale o morte cellulare del linfocita per apoptosi. (5). La molecola costimolatoria per eccellenza è CD28, espresso costitutivamente dai linfociti T e in grado di legare le molecole B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) espresse sulle cellule APC attivate (6). Il segnale mediato da CD28 sinergizza con quello trasdotto dall'attivazione del TCR e induce una serie di modificazioni cellulari tra cui la trascrizione di IL-2 e l'espressione della catena α del recettore per IL-2 (CD25) che determina attivazione, espansione clonale e induzione delle fasi effettive del linfocita. (7). Della stessa famiglia di CD28 fa parte anche CTLA-4, una molecola costimolatoria espressa sulla membrana del linfocita T in seguito

all'attivazione e che regola negativamente l'attivazione linfocitaria competendo con CD28 per gli stessi ligandi (B7.1 e B7.2) (5).

ICOS rappresenta il terzo membro della famiglia di CD28 e contrariamente a CD28 è espresso solo in seguito all'attivazione. L'espressione di ICOS sulla superficie dei linfociti T è rapidamente indotta nelle prime fasi della differenziazione su entrambe le popolazioni linfocitarie Th (Th1 e Th2), ma l'espressione dopo l'attivazione rimane alta solo nella sottopopolazione Th2 (8). Dopo l'attivazione, i linfociti T possono differenziarsi in due sottopopolazioni funzionalmente distinte (Th1 e Th2), caratterizzate dalla produzione di uno spettro di citochine diverso; la popolazione Th1 produce molecole quali INF- γ , IL-12 e TNF α , media una risposta infiammatoria verso cellule infettate da virus o batteri intracellulari ed è importante in varie patologie autoimmuni organo specifiche, mentre la popolazione Th2 produce molecole quali IL-4, 5, 9, 10, 13, media le reazioni immunitarie di tipo umorali verso patogeni extracellulari e verso patogeni intestinali ed è coinvolta nelle reazioni allergiche grazie all'effetto che ha sulla produzione di IgE da parte dei linfociti B (9). L'attivazione di ICOS avviene tramite interazione con il suo ligando GL50 (B7h o B7RP1) espresso costitutivamente da certe APC come cellule B e macrofagi; ICOS non interagisce con i ligandi B7.1 e B7.2 di CD28/CTLA-4. ICOSL può essere espresso anche da tessuti non linfoidi in seguito a stimoli di natura infiammatoria (10). Contrariamente ad altri membri della famiglia di CD28, l'interazione ICOS-ICOSL sembra essere esclusiva, dal momento che esperimenti di Knock Out (KO) di ICOS o di ICOSL sul topo presentano un fenotipo simile (11). A differenza di CD28 la cui attivazione induce la sintesi di IL-2, l'attivazione di ICOS nel topo sembra indurre la sintesi di IL-4 e non quella di IL-2. Livelli di IL-2 incapaci di sostenere una risposta immunitaria completa ma in grado solo di indurre le fasi iniziali della proliferazione sembrano essere percepiti in seguito all'attivazione di ICOS in un lavoro di Riley e coll. (12). Probabilmente la costimolazione di CD28, grazie alla sua capacità di indurre la sintesi di IL-2, è importante nelle fasi iniziali dell'attivazione, mentre la costimolazione di ICOS sembra essere importante nell'attivazione secondaria o nell'attivazione delle cellule memoria (13). Le cellule T attivate mediante costimolazione con ICOS sono incapaci di proliferare a lungo termine e vanno incontro ad apoptosi dopo circa 3-5 divisioni cellulari (12). La costimolazione selettiva di ICOS al posto di CD28 in periferia conferirebbe funzioni effettrici alle cellule T senza tuttavia conferire la capacità di proliferare a lungo termine (dovuta alla mancanza di IL-2) (12). Questa ipotesi è supportata dal fatto che l'espressione di ICOS è aumentata nelle cellule T effettrici (14) e che le funzioni effettrici delle cellule T sono stimulate dalla costimolazione con ICOS (15). La costimolazione con ICOS potrebbe quindi essere un meccanismo per attivare rapidamente le cellule memoria ed effettrici senza indurre un'espansione clonale che potrebbe favorire lo sviluppo di reazioni autoimmuni (16).

Dati sperimentali dimostrano che topi knock out per ICOS e per CD28 mostrano difetti simili ma non uguali nella risposta cellulare di tipo B mediata da cellule T, suggerendo che l'effetto biologico delle due molecole costimolatorie nella maturazione dei linfociti B non sia ridondante (17). Una possibilità è che per avere un'ottimale attivazione dei linfociti T sia necessaria la costimolazione da parte di entrambe le molecole in vivo. Diversamente potrebbe essere che ICOS e CD28 agiscono in momenti diversi dell'attivazione T. Basandosi sui dati inerenti i tempi d'espressione dei due recettori e dei loro ligandi, sembra che CD28 sia importante nelle fasi iniziali dell'attivazione mentre ICOS nel mantenimento delle funzioni effettrici delle cellule T e quindi anche nell'indurre una risposta da parte delle cellule B (produzione di citochine ed espressione di CD40L) (18).

LE MALATTIE AUTOIMMUNI E ICOS

Le malattie autoimmuni rappresentano l'errore più grande che il sistema immunitario possa compiere. Il sistema immunitario è quel sistema biologico costituito da cellule (ad es. linfociti, macrofagi...) e da molecole (ad es. citochine) che ha lo scopo di difendere il nostro organismo dalla comparsa di malattie dovute ad agenti infettivi patogeni quali virus, batteri, funghi etc..., e dai tumori. Una delle caratteristiche di questo sistema è la capacità di discriminare tra antigeni *self* e *not-self*, garantendo la risposta immunitaria solo contro sostanze estranee all'organismo e la tolleranza verso gli antigeni autologhi (fenomeno noto come tolleranza al *self*). La perdita di suddetta tolleranza si traduce in risposte immuni verso i propri costituenti antigenici, dando origine a malattie autoimmuni. Altra caratteristica del sistema immunitario è la capacità di autolimitarsi: quando le cellule del sistema immunitario si attivano si ha l'espressione di particolari geni coinvolti nella proliferazione e nelle funzioni effettrici dei linfociti, ma contemporaneamente si induce anche l'espressione dei geni che determinano l'apoptosi della maggior parte dei linfociti attivati, fenomeno noto come "spegnimento della risposta immunitaria". L'attivazione dei linfociti serve infatti a eliminare l'antigene e una volta realizzato il loro scopo essi sono destinati ad andare incontro ad apoptosi. Una piccola porzione di essi non muore e permane come cellule memoria, importanti nelle successive stimolazioni da parte dello stesso antigene. L'attivazione dei linfociti a cellule effettrici è antigene specifica e deve essere quindi limitata nel tempo: dopo che l'antigene è stato eliminato, i linfociti devono andare incontro a morte cellulare programmata o apoptosi. Lo spegnimento della risposta immunitaria è essenziale per garantire protezione nei confronti dell'autoimmunità: se i linfociti non vanno in apoptosi dopo che gli antigeni *not-self* sono stati eliminati, c'è il rischio che riconoscano per errore antigeni *self*. La teoria del mimetismo molecolare spiega infatti che molte proteine virali hanno determinanti antigenici simili a quelli di proteine

autologhe: se i linfociti non vanno incontro ad apoptosi e rimangono attivi dopo che gli antigeni estranei sono stati eliminati possono riconoscere per errore epitopi autologhi e scatenare una reazione autoimmune. Un difetto di apoptosi può favorire una risposta autoimmune in differenti modi. Primo, le cellule apoptotiche esprimono in membrana autoantigeni inusuali per una cellula normale, e il rallentamento della morte cellulare rende questi antigeni *self* più esposti nel tempo (19). Secondo, alterazioni del processo apoptotico possono scatenare fenomeni necrotici che, a differenza dell'apoptosi, determinano la comparsa di reazioni infiammatorie che favoriscono la presentazione di antigeni autologhi al sistema immunitario. Verosimilmente, autoanticorpi associati a malattie autoimmuni riconoscono epitopi che si generano durante la degradazione apoptotica di proteine e DNA (20) o specifici fosfolipidi quali fosfatidilserina e cardiolipina, espressi sulla superficie delle cellule apoptotiche (21). L'apoptosi può essere indotta passivamente in seguito all'assenza di segnali di sopravvivenza (22) o attivamente tramite il coinvolgimento di recettori cosiddetti di morte (23). I più noti recettori di questo tipo sono quelli appartenenti alla superfamiglia dei Recettori dei Fattori di Necrosi Tumorale (TNFR), che interagiscono con molecole appartenenti alla superfamiglia dei Fattori di Necrosi Tumorale (TNF). Il più noto di questi recettori è Fas (Apo-1/CD95), il cui meccanismo d'azione si attua attraverso l'attivazione a catena di una serie di proteasi definite caspasi (*cysteine-dependent aspartate-directed proteases*) (24).

Dal punto di vista clinico si dividono in sistemiche come ad es. la Sindrome Autoimmune LinfoProliferativa (ALPS) e il Lupus Eritematoso Sistemico (LES), e organo-specifiche come ad es. il diabete mellito di tipo1 (T1DM), la sclerosi multipla (MS) e la tiroidite di Hashimoto (HT); dal punto di vista invece del meccanismo immuno-patogenetico si distinguono in malattie mediate da anticorpi, che danno origine a danni tipicamente sistemici, e mediate da linfociti, che invece determinano un danno prevalentemente organo o tessuto-specifico.

L'autoimmunità rappresenta un problema abbastanza comune e sempre più crescente nella popolazione, basti pensare che la frequenza stimata nei paesi sviluppati è di circa il 5%. Queste patologie sono multifattoriali, sono quindi causate dalla combinazione di fattori genetici e di fattori ambientali che agiscono su quello che è il background genetico di un individuo influenzando il rischio genetico che ognuno di noi ha di sviluppare una data patologia. Una adeguata conoscenza dei geni e dei meccanismi coinvolti nell'autoimmunità permetterebbe di sviluppare adeguate terapie e adeguati piani di prevenzione. Le modificazioni del genoma umano che alterano i meccanismi fisiologici coinvolti nella suscettibilità all'autoimmunità sono per definizione fattori di rischio causali primari. Di qui l'importanza di studi di genetica posizionale per identificare i geni e le loro varianti che conferiscono predisposizione a determinate malattie autoimmuni.

La regione cromosomica 2q33 è stata associata in molti studi a malattie autoimmuni comuni quali le tiroiditi, la sclerosi multipla, il diabete mellito e a malattie immuno mediate quali il morbo celiaco. Di questa regione fanno parte tre geni importanti nella regolazione dell'attivazione dei linfociti T: CTLA-4, CD28 e ICOS.

La maggior parte degli studi genetici sulle molecole della regione 2q33 riguarda l'associazione di CTLA-4 con diverse patologie autoimmuni quali il diabete mellito, la malattia di Graves, la malattia di Hashimoto, la Miastenia gravis (25, 26, 27, 28). Topi KO per CTLA-4 sviluppano una forma di autoimmunità letale precoce (29). L'inibizione mediante anticorpi di CTLA-4 in topi con EAE all'esordio clinico (la forma analoga della sclerosi multipla nel topo) determina un peggioramento della malattia e un aumento della mortalità (30, 31), mentre il trattamento con anticorpi agonisti di CTLA-4 previene la comparsa della malattia e ne migliora il quadro clinico (32, 33). CTLA-4 ha un ruolo inibitorio nell'attivazione dei linfociti e controbilancia l'effetto attivatorio di CD28; mutazioni o polimorfismi che diminuiscono l'espressione e/o l'attività di CTLA-4 (o che aumentano l'espressione e/o attività di CD28) possono rappresentare un fattore di rischio genetico che predispone alle malattie autoimmuni.

I microsatelliti dell'introne 4 di ICOS sono stati oggetto di indagine in studi di associazione con malattie autoimmuni quali il diabete mellito nella popolazione giapponese e le tiroiditi autoimmuni nella popolazione americana e hanno dato riscontro negativo (25, 26, 27). Recentemente uno studio finlandese ha pubblicato l'associazione tra alcuni polimorfismi di ICOS e il morbo celiaco (34). Finora nessuno studio di associazione genetica è stato pubblicato su ICOS e la sclerosi multipla.

ICOS E SCLEROSI MULTIPLA

I motivi che giustificano uno studio genetico di associazione tra ICOS e la sclerosi multipla sono i seguenti:

- il gene ICOS è localizzato in una regione cromosomica (2q33) associata a malattie autoimmuni comuni e a malattie immuno mediate (diabete mellito, sclerosi multipla, tiroiditi, morbo celiaco)
- ICOS è una molecola coinvolta nella regolazione dell'attivazione e del differenziamento dei linfociti T, eventi entrambi cruciali in una patologia autoimmune Th1 mediata come la sclerosi multipla

- esistono lavori che confermano l'importanza di ICOS nell'immunopatogenesi dell'EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, il modello murino della sclerosi multipla)

In seguito all'induzione dell'EAE in topi SJL con la proteina proteolipidica (PLP), ICOS e ICOSL vengono iperespressi dai linfociti T CD3+ che infiltrano il sistema nervoso centrale (SNC) prima della comparsa della malattia, suggerendo che ICOS abbia un ruolo nell'immunopatogenesi della malattia (35). L'impiego di anticorpi anti ICOS per inibire l'interazione con il suo ligando può avere un duplice effetto sul quadro clinico degli animali, a seconda del momento in cui l'inibizione avviene: se l'inibizione avviene nelle fasi iniziali (1-10 giorni dall'immunizzazione con PLP) si ha un peggioramento della malattia (aumento dell'espressione di citochine proinfiammatorie e chemochine nel SNC, aumento dell'infiltrazione di cellule B/T, macrofagi e neutrofili nel SNC), se invece avviene nelle fasi effettrici della risposta immunitaria (9-20 giorni dall'immunizzazione) si ha il recupero dalla malattia sia a livello clinico che cellulare e molecolare (35). E' probabile che il blocco della via costimolatoria di ICOS nelle fasi iniziali della risposta immunitaria determini un aumento decisivo del rapporto Th1/Th2 che causa una maggiore proliferazione dei linfociti T antigene specifici e una maggiore produzione di INF- γ . L'EAE è una malattia Th1-mediata e una polarizzazione verso un fenotipo Th1 determina un peggioramento della malattia. Questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti con il KO di ICOS sui topi EAE (36). L'aggravamento della malattia potrebbe essere dovuto al fatto che la polarizzazione verso un fenotipo Th1 scatenata dal blocco della costimolazione di ICOS induce una maggiore espressione di determinati mediatori (citochine e chemochine) nel cervello di questi animali. Tra questi mediatori potenzialmente pericolosi per l'EAE ricordiamo, oltre ovviamente INF- γ , anche CCR1, RANTES, MCP-1, MIP-2, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12p35 (35). Le interazioni CCR1-RANTES e CCR2-MCP1 hanno un ruolo importante nell'immunopatogenesi dell'EAE: CCR1 e CCR2 sono espresse da monociti/macrofagi e microglia e sono attivati in seguito al legame con RANTES e MCP1, molecole per altro iperespresse nei topi con EAE (topi ko per CCR1 presentano minore incidenza e gravità della malattia, topi ko per CCR2 sono protetti dallo sviluppo della malattia). E' quindi verosimile che un' aumentata attivazione di monociti/macrofagi e microglia dovuta ad una maggiore espressione di queste chemochine (RANTES e MCP1) determini l'aggravamento della malattia che si osserva nei topi (35). MIP2 è un fattore chemotattico per i neutrofili nel topo e infatti si osserva un aumento del numero di neutrofili nelle lesioni del cervello dei topi con EAE, dato in accordo con un aumento dell'espressione MIP2. La somministrazione di IL-1 α determina un aggravamento della malattia e la somministrazione di IL-1 β inibisce l'anergia delle cellule T nei topi con EAE (37). IL-6 ha un ruolo nell'EAE in quanto topi ko per IL-6 sono protetti dallo sviluppo della malattia.

Se l'inibizione della via costimolatoria di ICOS avviene nelle fasi effettrici della risposta immunitaria (9-20 giorni dall'immunizzazione con PLP) si ha la remissione clinica dalla malattia associata ad una minore proliferazione linfocitaria, espressione di INF- γ e di altre citochine/chemochine e infiltrazione di leucociti nel SNC. Simili risultati hanno ottenuto Sporici e coll dimostrandolo che bloccando la via costimolatoria di ICOS con anticorpi in topi con EAE già in corso si ottiene un miglioramento clinico (38). E' probabile che l'effetto e la funzione di ICOS cambino nel tempo man mano che la risposta immunitaria evolve; la capacità di indurre l'espressione sia di IL-10 che di INF- γ suggerisce che ICOS sia coinvolto nell'attivazione di cellule regolatorie e infiammatorie (38). Probabilmente il blocco della via di ICOS 9-20 giorni dall'immunizzazione ha un effetto positivo sulla malattia perchè esso agisce prevalentemente su cellule infiammatorie bloccandone l'attivazione.

Nell'EAE, i linfociti T antigene specifici (cioè PLP-specifici) che si trovano nelle lesioni del cervello sono meno del 4% e sono essenzialmente Th1 che agiscono reclutando altri leucociti non antigene specifici. Se si riuscisse ad inibire selettivamente l'attivazione di questa sottopopolazione di cellule T encefalolitogeniche probabilmente si inibirebbe anche il reclutamento non specifico di leucociti con risvolti positivi sulla malattia. Nel lavoro di Rottmann e coll., si è dimostrato che linfociti T ICOS+ si trovano nelle lesioni del cervello dei topi EAE prima ancora che si manifesti la malattia e che, almeno in parte, questi linfociti sono PLP-specifici. E' probabile che bloccando la via costimolatoria di ICOS si inibisca l'attivazione e la proliferazione di queste cellule T encefalitogeniche e quindi il successivo reclutamento di leucociti non antigene specifici. Le cellule che nel SNC potrebbero esprimere ICOSL sono astrociti e microglia, dal momento che sono in grado di attuare una costimolazione Th1 e Th2 indipendentemente dall'espressione di B7.1/2 (35). L'importanza dell'interazione ICOS-ICOSL nella patogenesi dell'EAE è confermata anche nello studio di Sporici e coll., dove si dimostra che l'attivazione delle cellule T encefalitogeniche richiede l'attivazione della via costimolatoria di ICOS (38). Nel suddetto lavoro si dimostra anche che in cellule T provenienti da topi EAE e coltivate con ICOS Ig in vitro, l'interazione ICOS-ICOSL è fondamentale per la produzione di IL-10 e di INF- γ ma non di IL-2 ed è indipendente dalla costimolazione di CD28 (38). Questi dati sono in accordo con la letteratura dove si è dimostrato che ICOS influenza la produzione di IL-10 e di INF- γ ma non di IL-2 come invece fa CD28 (3, 10). Un lavoro ha invece dimostrato il contrario, e cioè che bloccando la costimolazione mediata da ICOS si ha un effetto inibitorio sulla produzione di IL-2 (12). Se da una parte è vero che ICOSL induce la produzione di INF- γ nei topi, dall'altra è altrettanto vero che INF- γ induce a sua volta l'espressione di ICOSL attraverso un meccanismo NF-kB indipendente (INF- γ potenzia invece l'espressione delle molecole B7 attraverso un meccanismo NF-kB dipendente).

La costimolazione di ICOSL fornisce un segnale proliferativo anti-apoptotico alle cellule encefalitogeniche T nei topi EAE e il blocco di questa via induce apoptosi soprattutto nelle cellule memoria rispetto alle cellule naive. Questi dati rispecchiano le precedenti scoperte che CD28 protegge dall'apoptosi preferenzialmente le cellule naive rispetto alle cellule memoria, suggerendo che invece ICOS abbia proprio un ruolo sulla sopravvivenza delle cellule memoria (38).

Recenti esperimenti condotti su PBMCs umani (peripheral blood mononuclear cells) indicano che ICOS modula l'espressione sia di citochine Th1 che Th2 indipendentemente da CD28 nelle cellule T CD4+ memoria ed effettrici, ma che le cellule Th2 esprimono comunque più ICOS delle Th1 (39). E' possibile che ICOS abbia un ruolo nella modulazione della seconda fase della risposta immunitaria. A livello periferico molti tessuti di natura non linfoide possono esprimere molecole MHC di classe II e comportarsi quindi come molecole APC non professionali influenzando la risposta immunitaria delle cellule autoreattive. Proprio in questi tessuti che mancano delle molecole B7.1/2, il segnale mediato da ICOS potrebbe avere un ruolo decisivo, come recentemente dimostrato nel caso delle miopatie infiammatorie (40). Nella sclerosi multipla, la locale (ri)attivazione delle cellule T autoreattive nel SNC da parte delle cellule che esprimono i complessi MHC II-antigene è un evento fondamentale nell'indurre il danno autoimmune contro la guaina mielinica (41). Quanto detto assume particolare importanza se si pensa che le cellule T autoreattive nei pazienti con sclerosi multipla dipendono meno dalla costimolazione di CD28 rispetto alle cellule T dei soggetti sani (42) e inoltre che nei pazienti con sclerosi multipla esistono cellule T reattive alla mielina che sono CD4+ e CD28- e che sono (ri)attivate perifericamente o nel SNC in assenza delle molecole B7.1/2 (43).

Da quanto detto emerge abbastanza chiaramente che ICOS ha un ruolo nell'immunopatogenesi della sclerosi multipla e di qui l'importanza di studiare il gene e la molecola sotto tutti i suoi aspetti.

ICOS: ANALISI DEL GENE

ICOS è codificato da un gene polimorfico caratterizzato da siti regolatori, microsatelliti, mutazioni e SNPs (single nucleotide polymorphisms) distribuiti nel seguente modo (26, 27, 34, 44, 45):

regione 5'UTR:

- 23 siti per regolatori trascrizionali (di cui 5 per Sp1, 5 per Pu1, 5 per STAT-1, 4 per GATA-3, 1 per NF-kB, 1 per AP-1, 1 per AP-2, 1 per NF-1)
- 8 SNPs: p-668 G/A, p-842 T/A, p-1388 G/A, p-1817 T/C, p-2119 C/T (SNP all'interno di un sito per NF-kB), p-2150 C/T, p-2394 T/C (SNP all'interno di un sito per Sp1), p-3479 C/T.

(la numerazione dei polimorfismi, se non indicato diversamente, fa riferimento a Genebank accession number AF488347)

sequenze codificanti (ESONI)

- mutazione silente in eterozigosi in posizione p4026 A/G (+597 A/G*) nell'ultimo codone dell'esone 5 (frequenza su controlli sani 1/220 cromosomi).

sequenze non codificanti (INTRONI)

- introne 1: +173 T/C*
- introne 3: cinque polimorfismi p1203 C/T, p1323 C/G (possibile enhancer), p1551 A/G, p1974 A/G, p2003 C/T
- introne 4: cinque polimorfismi p2412 A/T, p2658 C/T, p3168 C/A, p3396 G/T (sito di Sp1), p3990 G/T. Inserzione di una G e 2 microsatelliti: Tn vicino sito donatore di splicing e (GT)n vicino sito accettore di splicing.

regione 3' UTR

- 10 polimorfismi: p4031 A/C (+602 A/C*), p4359 G/A (+930 G/A*), p4888 A/T (+1459 A/T*), p4993 T/C (+1564 T/C*), p5053 C/T (+1624 C/T*), p5291 A/G (+1862 A/G*), +1720 C/T*, p5436 G/A (+2007 G/A*), p5462 G/A (+2033 A/G*), p5802 G/C (+2373 G/C*).

**I polimorfismi al 3' UTR sono presenti in letteratura anche con la numerazione relativa al cDNA, +1 è la prima base del codone di inizio ATG.*

Le due regioni microsatelliti nell'introne 4 di ICOS, Tn e GTn sono state oggetto di indagine in uno studio di associazione giapponese sul diabete mellito senza aver dato tuttavia un riscontro di associazione con la malattia (27). Esito negativo ha anche ottenuto uno studio genetico sulla popolazione americana e le tiroiditi che ha preso in considerazione solo il microsatellite GTn nell'introne 4 (26). L'associazione di ICOS è stata invece stabilita con il morbo celiaco nella popolazione finlandese per mezzo di un lavoro che ha preso in considerazione il polimorfismo nell'introne 1 e tutti quelli del 3'UTR; gli autori hanno utilizzato il Transmission Disequilibrium Test (TDT) per valutare la trasmissione preferenziale degli alleli e degli eventuali aplotipi e hanno ottenuto risultati significativi per il polimorfismo dell'introne 1 (+173 T/C) e per l'aplotipo costituito dai seguenti alleli T (+173), C (+602), A (+930), T (+1459), C (+1564), T (+1624), G (+1862) C (+2373) (34).

SCOPO DEL LAVORO

Dal momento che ICOS sembra essere coinvolto nell'immunopatogenesi e nella gravità della forma murina della sclerosi multipla (EAE), lo scopo di questo lavoro è valutare l'importanza dei polimorfismi e/o mutazioni dell'esone 5 e della regione 3'UTR del gene ICOS nella suscettibilità alla sclerosi multipla.

RISULTATI E DISCUSSIONE

(A) Sequenziamento della regione 3' UTR e dell'esone 5 del gene ICOS

La regione del DNA corrispondente al 3'UTR e all'esone 5 di ICOS è stata amplificata mediante PCR e sottoposta ad analisi tramite sequenziamento diretto per cercare mutazioni e polimorfismi noti e non noti in 48 controlli sani e 51 pazienti con sclerosi multipla. Dai dati della letteratura in questa regione sono noti 10 polimorfismi* (+602 A/C,+930 G/A,+1459 A/T, +1564 T/C, +1624 C/T, +1720 C/T, +1862 A/G, +2007 G/A, +2033 G/A, +2373 G/C) e una mutazione in posizione +597 A/G nell'esone 5.

(*Numerazione relativa al cDNA, +1 è la prima base del codone di inizio ATG).

I risultati del sequenziamento si possono così riassumere:

1. polimorfismi trovati nelle due popolazioni (controlli e pazienti): +602 A/C, +930 G/A, +1459 A/T, +1564 T/C, +1624 C/T, +1862 A/G, +2007 G/A, +2373 G/C.
2. polimorfismi che non sono mai stati trovati in nessun controllo e in nessun paziente: +597 A/G (esone 5), +1720 C/T, +2033 G/A.
3. polimorfismi nuovi: +1694 C/T.
4. valore in % dell'allele più frequente di ogni polimorfismo nella popolazione dei controlli e in quella dei pazienti (tabella 1)

Abbiamo sequenziato la regione che corrisponde al 3'UTR del gene ICOS alla ricerca di SNPs e mutazioni, ed abbiamo riscontrato che non tutte le variazioni documentate in letteratura sono presenti nella nostra popolazione. Inoltre è stato trovato un polimorfismo nuovo mai descritto in letteratura (+1694 C/T). Le frequenze dei singoli polimorfismi sono diverse nelle popolazioni dei controlli e dei pazienti; questo suggerisce che alcuni polimorfismi, quelli più frequenti nei pazienti, potrebbero essere coinvolti nella suscettibilità alla malattia.

Inoltre, nell'ambito della popolazione dei controlli o dei pazienti, alcuni polimorfismi sembrano avere la stessa frequenza e formare due gruppi, uno costituito dai polimorfismi +930 G/A, +1459 A/T, +1624 C/T, +1862 A/G e l'altro costituito dai polimorfismi +1564 T/C e +2007 G/A. Dal momento che questi SNPs hanno la stessa frequenza nei controlli e la stessa frequenza nei pazienti (94% e 88% il primo gruppo e 80% e 67% il secondo gruppo) abbiamo supposto che avrebbero potuto essere associati.

(B) Analisi e frequenze degli aplotipi

Per confermare la suddetta associazione di polimorfismi abbiamo utilizzato un software statistico (Arlequin program) che calcola le possibili combinazioni aplotipiche in base ai dati ottenuti dal sequenziamento dei 48 controlli e 51 pazienti. I risultati del programma indicano 5 possibili aplotipi (tabella 2).

I dati ottenuti dagli aplotipi confermano l'associazione tra i polimorfismi all'interno dei due gruppi, vale a dire tra i polimorfismi costituenti il primo gruppo (+930 G/A, +1459 A/T, +1624 C/T, +1862 A/G) e tra i polimorfismi costituenti il secondo gruppo (+1564 T/C e +2007 G/A).

Successivamente abbiamo calcolato le frequenze dei cinque aplotipi nella popolazione dei controlli e dei pazienti (tabella 3):

Dalla tabella 3 si evince che gli aplotipi 4 e 5 hanno una frequenza relativamente bassa in entrambe le popolazioni, ci siamo allora concentrati per il momento sui primi 3 aplotipi. L'aplotipo 1 risulta essere più frequente nei controlli, mentre gli aplotipi 2 e 3 nei pazienti.

Dall'analisi delle frequenze degli aplotipi nei controlli e nei pazienti (tabella 3), abbiamo quindi trovato un aplotipo (1) che sembra essere protettivo dal momento che è più frequente nei controlli, e due aplotipi (2 e 3) che sembrano essere predisponenti dal momento che sono più frequenti nei pazienti. Osservando gli aplotipi 2 e 3 abbiamo riscontrato che ciò che accomuna entrambi gli aplotipi sono l'allele C nella posizione +602, l'allele C nella posizione +1564, l'allele A nella posizione +2007; i polimorfismi in queste tre posizioni sono quindi importanti nel discriminare tra l'aplotipo "predisponente" (1) e gli aplotipi "protettivi" (2 e 3). Abbiamo deciso di focalizzare la nostra attenzione su uno di questi tre polimorfismi, il polimorfismo +1564 T/C e di screenare per esso una popolazione di 265 controlli e 284 pazienti, i risultati sono riportati in tabella 4:

La tabella 4a rappresenta i valori in % degli alleli e dei genotipi del polimorfismo +1564 T/C nei pazienti e nei controlli, mentre la tabella 4b riporta i valori assoluti dei risultati, con le rispettive p , e i valori dell'Odd Ratio (OR).

Dai risultati riportati emerge che:

- l'allele C in posizione +1564 T/C, è significativamente più frequente nei pazienti, e determina una probabilità di sviluppare la malattia 1,46 volte superiore rispetto all'allele T (OR= 1,46);
- il genotipo CT è significativamente più presente nei pazienti e determina una probabilità di sviluppare la malattia 1,64 volte superiore rispetto ad un genotipo diverso (OR= 1,64).

(C) Un possibile ruolo dei polimorfismi al 3'UTR nella stabilità dell'mRNA di ICOS

L'analisi dell'esone 5 e della regione 3' UTR del gene ICOS non ha evidenziato nè mutazioni nè polimorfismi capaci di cambiare la sequenza aminoacidica della proteina. Dati riportati in letteratura mostrano che, polimorfismi nella regione 3' UTR di un gene, possono influenzare la stabilità e/o la velocità di degradazione del mRNA. Per testare questa ipotesi abbiamo condotto un test funzionale preliminare su linfociti di due soggetti sani con un corredo genomico diverso per i polimorfismi di ICOS per valutare eventuali differenze nella risposta linfocitaria in termini di espressione della molecola e di proliferazione cellulare. L'esperimento è stato condotto su un individuo omozigote per l'aplotipo "protettivo" (indicato come "11") e su un individuo omozigote per l'aplotipo "predisponente" (indicato come "22").

L'espressione della molecola è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica a diversi giorni dall'attivazione (effettuata con PHA + IL-2); in tabella 5 è riportata la percentuale di linfociti che esprimono ICOS, sull'intera popolazione cellulare (PBMC). Si può vedere come dopo due giorni dall'attivazione i PBMC del soggetto omozigote per l'aplotipo predisponente presentino un minor numero di linfociti esprimenti ICOS mentre tale differenza si appiattisce nei giorni successivi.

La proliferazione cellulare è stata valutata sui PBMCs dei due donatori considerati attivandoli via CD3 o CD3+ICOS, e rilevando l'incorporazione della Timidina triziata nelle ultime 6 ore di tre giorni di coltura. Si può vedere in Tabella 6 che mentre i PBMC del donatore con aplotipo "protettivo" rispondono normalmente alla costimolazione mediata da ICOS, i PBMC dell'altro soggetto non sembrano reagire adeguatamente allo stimolo costimolatorio.

Questi dati preliminari possono farci ipotizzare soltanto ad una minore stabilità del messaggero del gene ICOS nel secondo soggetto analizzato.

CONCLUSIONI

Il risultato dell'analisi della regione genomica corrispondente all'esone 5 e alla regione 3' UTR del gene ICOS dimostrano che è stato riscontrato un polimorfismo e due conseguenti aplotipi di suscettibilità alla sclerosi multipla un nuovo polimorfismo non ancora noto in letteratura (+1694 C/T). Inoltre è stato confermato che esiste un forte linkage disequilibrium tra i polimorfismi della regione 3' UTR.

STUDI FUTURI

In futuro si pensa di estendere l'analisi a più pazienti e a regioni a monte del 3'UTR per meglio definire eventuali nuovi aplotipi. Inoltre vogliamo analizzare possibili correlazioni cliniche con i dati ottenuti sugli aplotipi e indagare quindi sul possibile ruolo di ICOS sul decorso della malattia. In terza analisi si cercherà di valutare l'effetto dei polimorfismi/mutazioni sull'espressione e funzionalità della molecola.

BIBLIOGRAFIA

1. Redoglia V, Dianzani U, Rojo JM, Portoles P, Bragardo M, Wolff H, Buonfiglio, D, Bonisconi S, and Janeway CA jr. Characterization of H4: a murine T lymphocyte activation molecule functionally associated with the CD3/TCR. *Eur J Immunol*. 1996. 26: 2781-89.
2. Buonfiglio, D, Bragardo M, Bonisconi S, Redoglia V, Cauda R, Zupo S, Burgio VL, Wolff H, Franssila K, Gaidano G, Carbone A, Janeway CA jr, and Dianzani U. Characterization of a novel human surface molecule selectively expressed by mature thymocytes, activated T cells and subsets of T cell lymphomas. *Eu J Immunol*. 1999. 29:2863-74.
3. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R , Anagnostopoulos I, and Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulatory structurally and functionally related to CD28. *Nature*.1999. 397:263-66.
4. Donatella Buonfiglio, Manuela Bragardo, Valter Redoglia, Rosanna Vaschetto, Flavia Bottarel, Sara Bonisconi, Thea Bensi, Caterina Mezzatesta, Charles A. Janeway jr. and Umberto Dianzani. The T cell activation molecule H4 and the CD28-like molecule ICOS are identical. *Eur. J. Immunol*. 2000. 30: 3463–3467.
5. Thompson CB, Allison JP. The emerging role of CTLA4 as an immune attenuator. *Immunity*. 1997. 7:445-50.
6. Harding FA, McArthur JG, Gross A, Raulet DH, and Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*.1992. 356:607-9.
7. Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors. New pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Ann Rev Immunol* 2002; 20: 29-53.
8. Coyle, a.J., S. Lehar, C. Lloyd, J. Tian, T. Delaney, S. Manning, T. Ngyen, T. Burwell, H. Schneider, J.A. Gonzalo, M. Gosselin, L.R. Owen, C.E. Rudd, and J.C. Gutierrez-Ramos.. The CD28- related molecules ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 2000.13:95-105
9. Dong C., Nurieva R.I. Regulation of immune and autoimmune response by ICOS. *J. of autoimm* 2003. 00: 1-6
10. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T et al. T-cell costimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 1999. 402. 827-832.
11. Nurieva RI, Mai XM, Forbush K, Bevan MJ, Dong C. B7h is required for T cell activation, differentiation, and effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:14163-14168.

12. Riley JL, Blair PJ, Musser JT et al. ICOS costimulation requires IL-2 and can be prevented by CTLA-4 engagement. *J Immunol*. 2001;166:4943-4948
13. Tada Y et al.. CD28 deficient mice are highly resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol* 1999, 162. 203-208
14. Lohning M, Hutloff A, Kallinich T et al. Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J Exp Med*. 2003;197:181-193
15. Liu X, Bai XF, Wen J et al. B7H costimulates clonal expansion of, and cognate destruction of tumor cells by, CD8(+) T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 2001;194:1339-1348
16. Riley JL., June CH. The CD28 family: a T cell rheostat for therapeutic control of T cell activation. *Blood*, 2004.
17. Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science*. 1993;261:609-612
18. Gonzalo JA, Tian J, Delaney T et al. ICOS is critical for T helper cell-mediated lung mucosal inflammatory responses. *Nat Immunol*. 2001;2:597-604
19. Lorenz et al. Role of apoptosis in autoimmunity. *Apoptosis*. 2000 Nov;5(5):443-9. Review.
20. Takeda and Dynan. Autoantibodies against DNA double-strand break repair proteins. *Front Biosci*. 2001 Nov 01;6:D1412-22. Review. 2001
21. Matsuura et al., 1998
22. Bertolino et al., Death by neglect as a deletional mechanism of peripheral tolerance. *Int Immunol*. 1999 Aug;11(8):1225-38.
23. Sharma et al., 2000; Vincent C, 2001
24. Budihardjo et al., 1999; Hacker, 2000; Shy, 2002
25. Ueda H. et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA-4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003. 423. 506-511
26. Ban Y. et al. Analysis of the CTLA-4, CD28 and ICOS genes in autoimmune thyroid disease. *Genes and Autoimmunity*, 2003. 4. 586-593.
27. Ihara K. et al. Association studies of CTLA-4, CD28 and ICOS gene polymorphisms with type 1 diabetes in Japanese population. *Immunogenetics*, 2001. 53. 447-454.
28. Huang et al., Association of CTLA4 gene A-G polymorphism with type 1 diabetes in Chinese children. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000 Feb;52(2):153-7.
29. Waterhouse et al., 1995
30. Karandikar et al., CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med*. 1996 Aug 1;184(2):783-8.

31. Perrin et al., CTLA-4 blockade enhances clinical disease and cytokine production during experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol.* 1996 Aug 15;157(4):1333-6.
32. Khoury et al., Mechanisms of acquired thymic tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis: thymic dendritic-enriched cells induce specific peripheral T cell unresponsiveness in vivo. 1995.
33. Miller et al., Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE. *Immunity.* 1995 Dec; 3(6):739-45.
34. Haimila K et al. Genetic association of coeliac disease susceptibility to polymorphisms in the ICOS gene on chromosome 2q33. *Genes and immunity* 2004. 1-8
35. Rotmann JB. et al. The costimulatory molecules ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nature Immunol* 2001. vol 2. No 7. 605-611.
36. Dong C et a., ICOS costimulatory receptor is essential for T cell activation and function. *Nature* 2001. 409. 97-101.
37. Bourdoulous S et al., 1995. Anergy induction in encephalitogenic T cells by brain microvessel endothelial cells is inhibited by IL-1. *Eur J Immunol* 25.1176-1183
38. Sporici AR. et al., ICOS ligand costimulation is required for T cellencephalitogenicity. *Clinical Immunol* 2001. vol 100. No 3. 277-288.
39. Wiendl H et al. The CD28 related molecule ICOS: T cell modulation in the presence and absence of B7.1/2 and regulational expression in multiple sclerosis. *J neuroimmunol*, 2003. 140. 177-187.
40. Wiendl H et al. Muscle fibers and cultured muscle cells express the B7.1/2 related costimulatory molecole ICOSL: implications for the pathogenesis of inflammatory myopathies. *Brain* 2003.126. 1026-1035.
41. Hemmer B et al. New concepts i the immunopathogenesis of the multiple sclerosis, 2002. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 291-301.
42. Lovett-Rache AE et al. Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28 mediated costimulation in MS patients. A marker of memory/activated T cells. *J clin. invest.* 1998. 101. 725-730.
43. Markovic-Plese S et al. CD4+ CD28- costimulation independent T cells in MS. *J clin invest* 2001. 108. 1185-1194.
44. Haimila KE et al. Genetics polymorphisms of the human ICOS gene. 2002. *Immunogenetics*, 53. 1028-1032

45. Haaning Andersen AD et al. Allelic variation of the inducible costimulator gene: detection of polymorphisms, analysis of the promoter region and extended haplotype estimation. 2003. 61. 276-285.

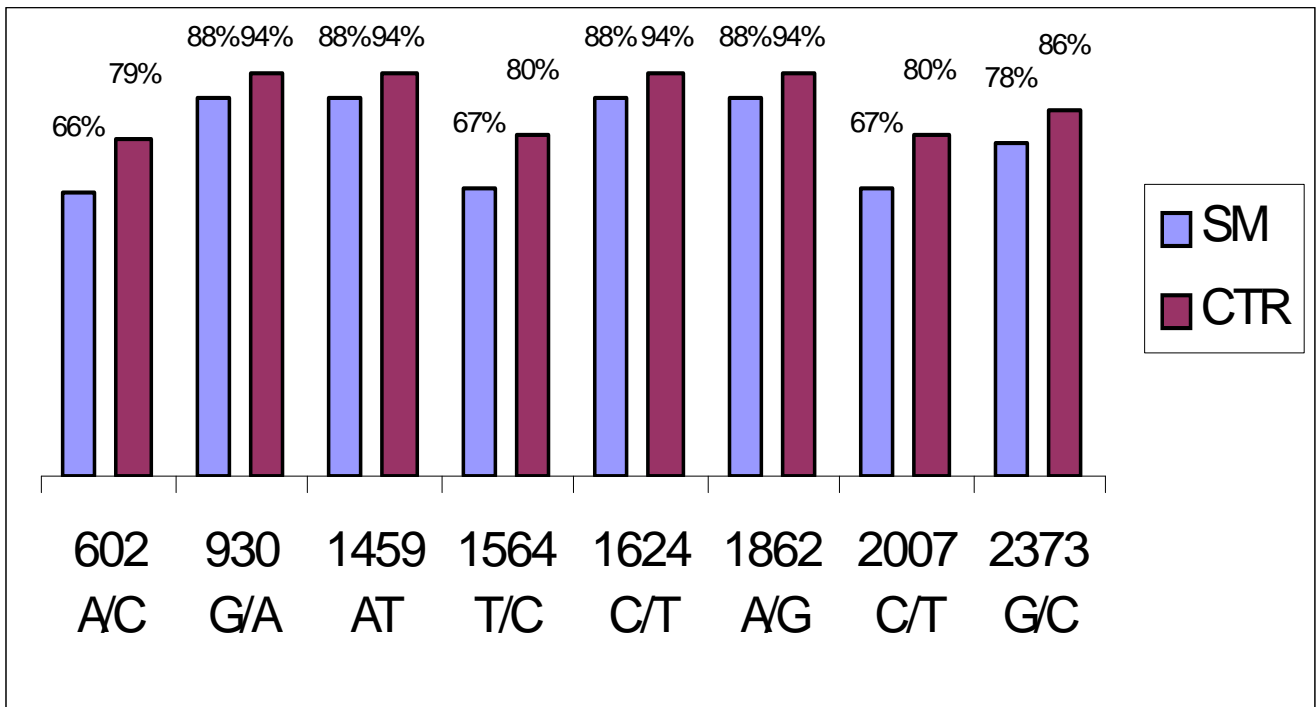


Tabella 1

Tabella 2

	602 A/C	930 G/A	1459 AT	1564 T/C	1624 C/T	1862 A/G	2007 C/T	2373 G/C
1	A	G	A	T	C	A	G	G
2	C	G	A	C	C	A	A	C
3	C	A	T	C	T	G	A	G
4	C	G	A	T	C	A	G	G
5	C	G	A	T	C	A	G	C

Tabella 3

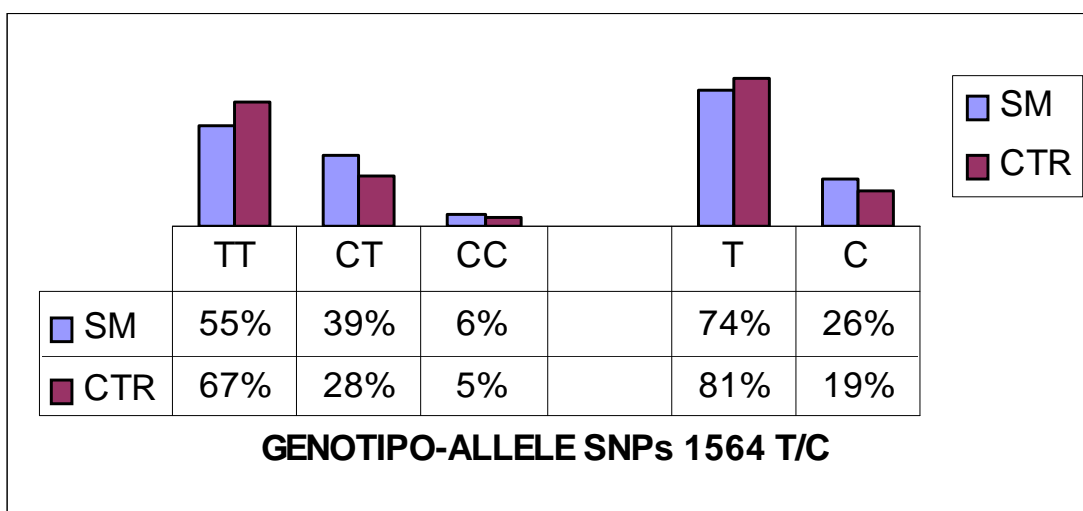
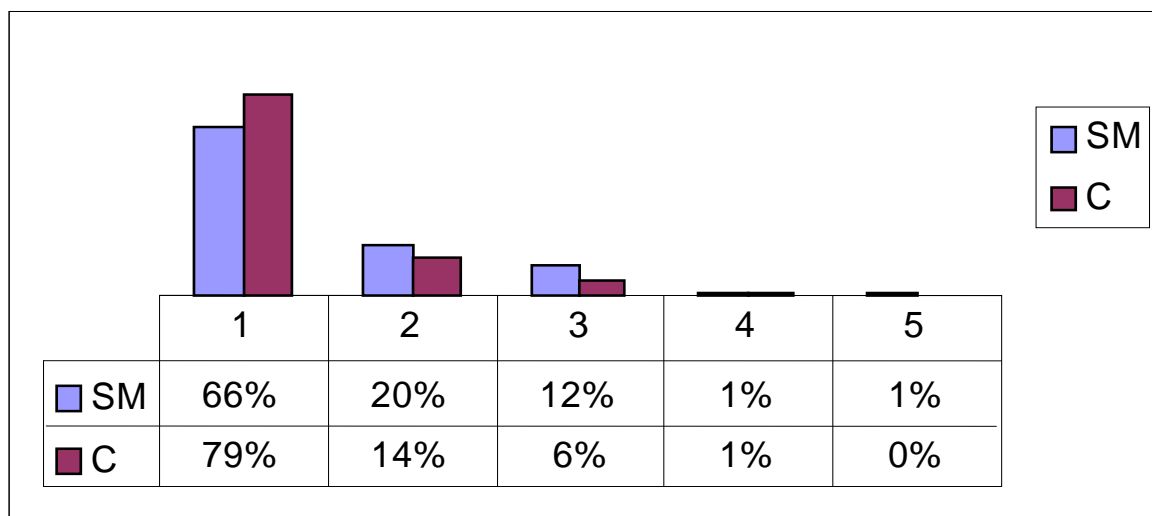


Tabella 4a

	hw=0,87	hw=0,08				
genotipi	SM	CTR	p value	OR		OVERALL
TT	157	178	p= 0.005	0,6	(0,42-OR-0,87)	p=0,015
CT	109	73	p= 0.009	1,64	(1,12-OR-2,39)	
CC	18	14	p= 0.73	1,21	(0,56-OR-2,64)	
	tot 284	tot 265				
aplotipi						p=0,011
T	421	429	p= 0,011	0,68	(0,51-OR-0,92)	
C	145	101	p= 0,011	1,46	(1,09-OR-1,97)	
	tot 566	tot 530				

Tabella 4b

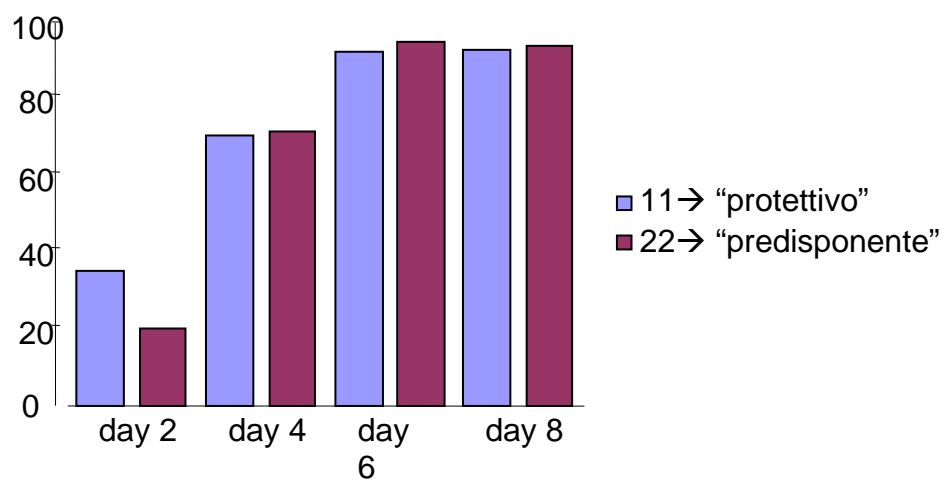
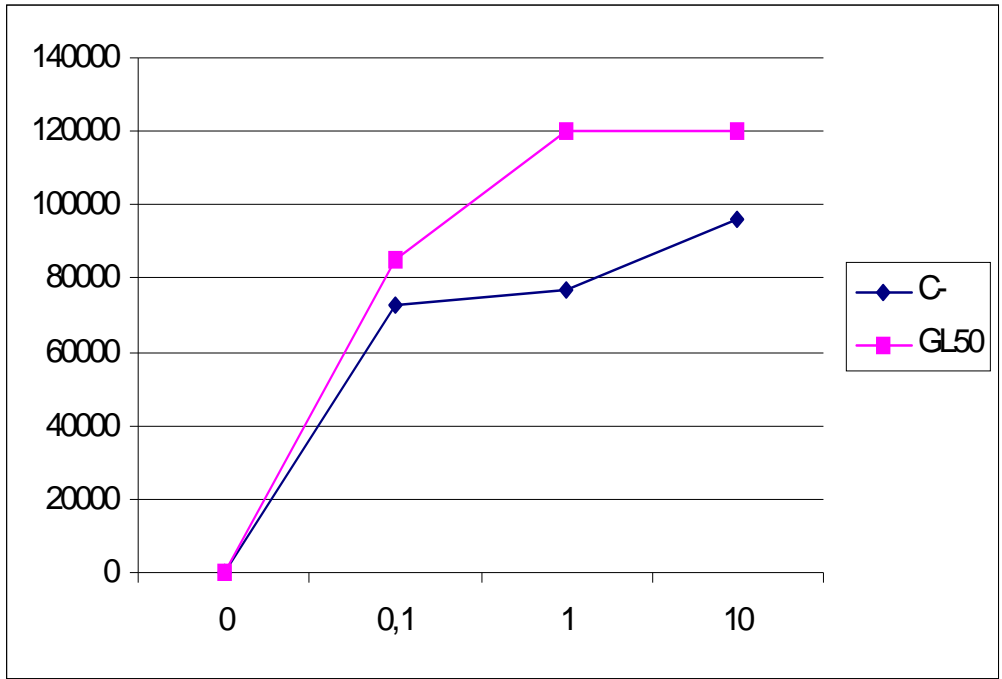
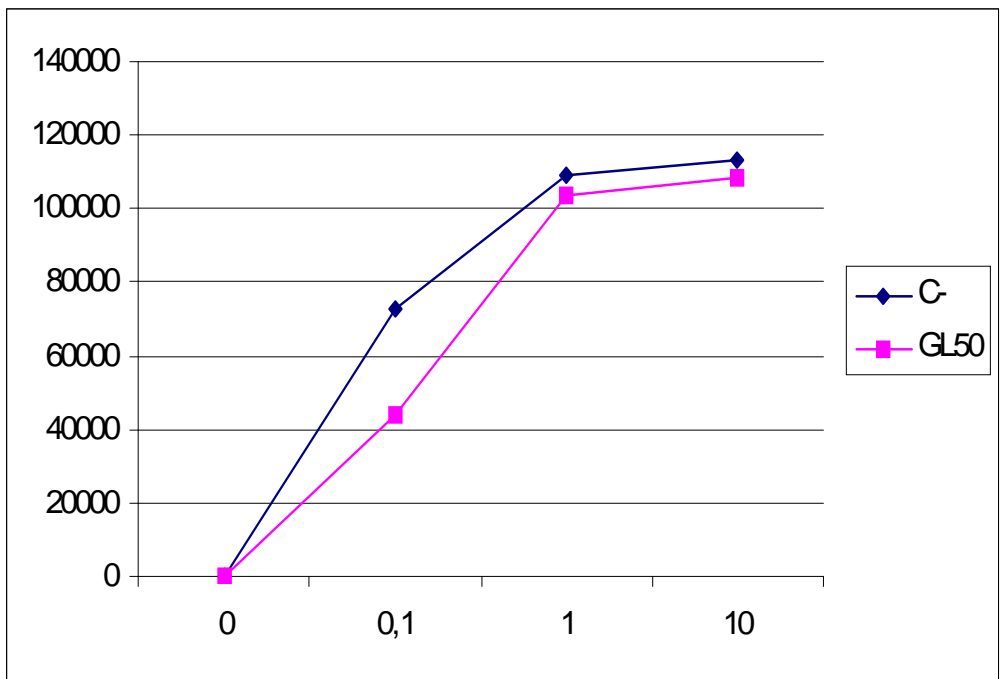


Tabella 5



11 → "protettivo"



22 → "predisponente"

Tabella 6

ATTIVITA' FORMATIVA SVOLTA:

- Corso di Statistica. Coordinatore: Prof. Magnani.
- Approccio allo studio dei geni di suscettibilità alle malattie multifattoriali. Prof. D'Alfonso.

Seminari Interni al Dipartimento di Scienze Mediche

Anno 2002/03

23 Gennaio 2003

Prof. Gianluca Gaidano

Applicazioni di medicina molecolare alla diagnosi e prognosi
delle neoplasie

28 Gennaio 2003

Dr. Daniela Cilloni

Strategie di valutazione della malattia minima residua in
Oncoematologia

29 Gennaio 2003

Dott. Ennio ONGINI

Farmaci innovativi per il trattamento di malattie neurodegenerative

30 Gennaio 2003

Dr. Martino Introna

Meccanismi molecolari di azione degli anticorpi terapeutici

27 febbraio 2003

Vittorio PERFETTI M.D.

“La *Drosophila melanogaster* come sistema modello: l'esempio del gene *minifly*.”

7 Marzo 2003

Prof. Pierangelo GEPPETTI

Trpv1 (recettore per la capsaicina): possibile ruolo fisiopatologico dalle vie respiratorie
all'emicrania

18 Marzo 2003

Dr. Anne Boullerne

"Multiplex role of Nitric Oxide in Multiple Sclerosis".

22 Maggio 2003

Dr.ssa Stefania Bottardi

Developmental stage-specific epigenetic control of human beta
globin gene expression is set in multipotent hematopoietic
progenitor cells

18 Giugno 2003
Prof. Fabrizio Loreni
Regolazione traduzionale dell'espressione genica: micro RNA e
sintesi dei ribosomi

Anno 2003/04

30 Gennaio 2004
Prof. . Magnus INGELMAN-SUNDBERG
Pharmacogenetics: a tool for a more efficient and safe drug therapy

30 gennaio 2004
BICE CHINI

LIPID RAFTS E RECETTORE PER L'OSSITOCINA:
MODULAZIONE DEL SIGNALLING E DEL CONTROLLO DELLA PROLIFERAZIONE
CELLULARE

10 marzo 2004
Prof. Guido Valesini
TNF, anti-TNF ed autoimmunità

31 Marzo 2004
Dr ANTONIA FOLLENZI
Espressione epato-specifica del fattore IX antiemofilico mediante l'uso di vettori lentivirali

3 maggio 2004
Dr Frédéric RIEUX-LAUCAT
"Genetic bases of the Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) subtypes"

20 maggio 2004
Alberto MARTINI
Le artriti croniche del bambino

25 maggio 2004
Antonio PUCCETTI
Virus e malattie autoimmuni

28 maggio 2004
ANGIOLO BENEDETTI
IL RETICOLO ENDOPLASMATICO UN LABIRINTO METABOLICO

18 Febbraio 2004

BICE CHINI

LIPID RAFTS E RECETTORE PER L'OSSITOCINA:
MODULAZIONE DEL SIGNALLING E DEL CONTROLLO DELLA PROLIFERAZIONE
CELLULARE

14 giugno 2004
PROF. DAVID MURPHY

BIOMEDICAL DISCOVERY USING MICROARRAYS:
PRINCIPLES, PROSPECT AND PROBLEMS.
FUNCTIONAL GENOMICS OF HYPOTHALAMIC HOMEOSTATIC PLASTICITY

29 giugno 2004
Prof. Emilio Hirsch

PI 3-KINASE γ CONTROLS CARDIAC CONTRACTILITY AND HYPERTROPHY
THROUGH KINASE-DEPENDENT AND INDEPENDENT FUNCTIONS

30 giugno 2004
Manlio FERRARINI
Meccanismi patogenetici della
Leucemia Linfatica Cronica

Partecipazione a Congressi Nazionali:

2st National Conference SIICA, Verona May 28-30, 2003.

3rd National Conference SIICA, Ischia, April 24-27, 2004

Publicazioni

- ***High levels of osteopontin associated to polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation.***

Chiocchetti A, Indelicato M, Bensi T, Mesturini R, Giordano M, Sametti S, **Castelli L**, Bottarel F, Mazzarino MC, Garbarini L, Giacopelli F, Valesini G, Santoro C, Dianzani I, Ramenghi U, Dianzani U. *Blood*, 2003.

- ***Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression***

Chiocchetti A., PhD, MS, Comi C., MD, Indelicato M., MS, **Castelli L.**, PhD, Mesturini R., MS, Bensi T., MS, Sametti S., MS, Mazzarino M.C., MD, Giordano M., PhD, MS, D'Alfonso S., PhD, Momigliano-Richiardi P., PhD, Liguori M., MD, Santoro C., MD, Monaco F., MD, Leone M., MD, and Dianzani U., MD, PhD. *Brain*, 2004 (submitted)

- ***Two snps in the 5' and 3'end of the opn (osteopontin) gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus.***

S. D'Alfonso¹, PhD, N. Barizzone¹, BD, M.Giordano¹, PhD, A. Chiocchetti¹, PhD, C. Magnani¹, PhD, **L. Castelli¹**, BD, M. Indelicato^{1,2}, BD, F. Giacopelli³, PhD, M. Marchini⁴, PhD, R. Scorza⁴, MD, M.G. Danieli⁵, MD, M. Cappelli⁵, MD, S. Migliaresi⁶, MD, B. Bigliardo⁶, MD, M.G. Sabbadini⁷, MD, E. Baldissera⁷, MD, M. Galeazzi⁸, MD, G.D. Sebastiani⁹, MD, G. Minisola⁹, MD, R. Ravazzolo¹⁰, MD, U. Dianzani^{1,2}, MD, P. Momigliano-Richiardi^{1,2}, PhD. *Arthritis & Rheumatism*, 2004 (submitted).