

Università degli Studi del Piemonte Orientale

“Amedeo Avogadro”

Dipartimento di Scienze Mediche



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare

Ciclo XXI (2005-2008)

***VARIAZIONI NEI GENI DI PERFORINA E OSTEOPONTINA
COME FATTORI DI PREDISPOSIZIONE
ALL'AUTOIMMUNITA'***

Dott.ssa Elisabetta Orilieri

Tutor: Prof. Umberto Dianzani

Relatore: Prof. Umberto Dianzani

INDICE

RIASSUNTO	5
ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI	9
INTRODUZIONE	10
1. Autoimmunità	10
1.1. <i>Eziologia e patogenesi delle malattie autoimmuni</i>	10
1.2. <i>Fattori ambientali</i>	11
1.3. <i>Predisposizione genetica</i>	13
1.3.1. <i>Associazione col sesso</i>	14
1.3.2. <i>Associazione con l'aplotipoHLA</i>	15
2. La sindrome autoimmune linfoproliferativa	16
2.1. <i>Autoimmunità e difetti genetici ereditari della funzione di Fas</i>	16
2.2. <i>Il modello dei topi lpr e gld</i>	16
2.3. <i>La sindrome autoimmune linfoproliferativa</i>	18
2.4. <i>La Malattia Autoimmune Linfoproliferativa di Dianzani (DALD), una variante di ALPS</i>	20
2.5. <i>Coinvolgimento dei difetti funzionali di Fas nello sviluppo di malattie autoimmuni comuni</i>	21
3. Diabete Mellito di Tipo 1	22
3.1. <i>Fattori genetici</i>	22
3.2. <i>Mediatori della distruzione delle cellule β nel T1DM</i>	25
3.3. <i>Autoantigeni β-cellulari</i>	27
3.4. <i>Autoanticorpi</i>	30
4. Perforina	32

<i>4.1. Struttura e funzione</i>	32
<i>4.2. Deficit di perforina nella Linfoistocitosi Emofagocitica Familiare</i>	34
5. Osteopontina	36
<i>5.1. Struttura</i>	36
<i>5.2. Funzioni</i>	37
<i>5.3. Ruolo nell'autoimmunità</i>	38
SCOPO GENERALE DELLA TESI	39
ARTICOLO 1	40
<i>Riassunto</i>	40
<i>Articolo</i>	42
<i>Conclusioni</i>	48
ARTICOLO 2	50
<i>Riassunto</i>	50
<i>Articolo</i>	52
<i>Conclusioni</i>	58
ARTICOLO 3	60
<i>Riassunto</i>	60
<i>Articolo</i>	62
<i>Conclusioni</i>	83
CONCLUSIONI GENERALI DELLA TESI	84
BIBLIOGRAFIA	87

RIASSUNTO

Le malattie autoimmuni sono dovute ad un'aggressione di tessuti *self* da parte del sistema immunitario specifico. Sono malattie multifattoriali dovute a fattori scatenanti ambientali, quali le infezioni, che agiscono su un substrato di suscettibilità genetica. Questa suscettibilità include geni codificanti molecole coinvolte nell'attivazione della risposta immunitaria (come le molecole MHC) o nel suo controllo (come geni che codificano per citochine o per molecole costimolatorie) e molecole coinvolte nelle risposte effettrici. Ulteriori geni possono essere quelli coinvolti nello spegnimento della risposta immunitaria, importanti per ricomprimere la popolazione di linfociti espansi nel corso della risposta immunitaria stessa, riducendo così il rischio di autoimmunità dovuta a *cross*-reazione tra antigeni *self* e non *self*.

La maggiore evidenza del coinvolgimento di questi ultimi geni è data dalla Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS), dovuta ad alterazioni ereditarie a carico della funzione del recettore di morte Fas, coinvolto nello spegnimento della risposta immunitaria. La malattia è caratterizzata da autoimmunità ematologiche, linfadenopatia e/o splenomegalia ed espansione di linfociti T doppi negativi (DN) per CD4 e CD8; questa espansione è assente in una variante della malattia detta Malattia Autoimmune Linfoproliferativa di Dianzani (DALD). L'ALPS è generalmente causata da mutazioni a carico del gene di Fas, ma mutazioni in altri geni sono state identificate in alcuni pazienti. La penetranza delle mutazioni causali dell'ALPS è spesso incompleta e lo sviluppo della malattia è favorito dal substrato genetico complessivo. Ad esempio, lo sviluppo della malattia è favorita da particolari varianti del gene di osteopontina (varianti *OPN^{high}*), che determinano la produzione di elevati livelli di questa citochina che è coinvolta nella risposta infiammatoria, ma che è anche capace di inibire la *Activation-Induced Cell Death* (AICD) dei linfociti, che rappresenta un meccanismo che affianca Fas nello spegnimento della risposta immunitaria.

Le alterazioni che causano o favoriscono lo sviluppo dell'ALPS possono anche essere coinvolte nello sviluppo di malattie autoimmuni comuni. Infatti, difetti funzionali di Fas sono stati osservati anche in una frazione di pazienti con Sclerosi Multipla (SM), Diabete Mellito di Tipo 1 (T1DM), malattie autoimmuni tiroidee e Polineuropatia Demyelinizzante Infiammatoria Cronica (CIDP). Inoltre, le varianti *OPN^{high}* favoriscono anche lo sviluppo di SM, T1DM e Lupus Eritematoso Sistemico (LES).

Scopo di questa tesi era l'identificazioni di ulteriori fattori genetici predisponenti per ALPS e di valutare il ruolo di questi fattori nello sviluppo di T1DM. I risultati hanno permesso di identificare in variazioni del gene di perforina (*PRF1*) un nuovo fattore predisponente per ALPS e di osservare che variazioni del gene di perforina e le varianti *OPN^{high}* del gene di osteopontina sono anche coinvolte nello sviluppo di T1DM.

i) Ruolo di *PRF1* in ALPS. Perforina è una proteina coinvolta nella citotossicità cellulo-mediata, che rappresenta un meccanismo fondamentale per l'eliminazione delle cellule infettate da virus, ma è anche coinvolta nello spegnimento della risposta immunitaria attraverso l'uccisione di cellule immuni attivate. Mutazioni bi-alleleliche di *PRF1* causano la Linfocitopenia Emofagocitica Familiare (FHL), una malattia ereditaria caratterizzata da aspetti linfoproliferativi. *PRF1* è stato sequenziato in 14 pazienti ALPS, 28 DALD e 816 controlli; sono state identificate due variazioni aminoacidiche: la sostituzione N252S è stata individuata in 2 pazienti ALPS e la sostituzione A91V in 6 pazienti DALD. La variazione N252S è risultata significativamente più frequente nei pazienti ALPS rispetto ai controlli (7.1% vs 0.1%; p=0.0016) conferendo un OR=62.7 (95% CI: 6-654.9); la variazione A91V è risultata significativamente più frequente nei pazienti DALD rispetto ai controlli (12.5 % vs 4.6%; p=0.016) conferendo un OR=3 (95% CI: 1.2-7.1). La co-presenza della variazione A91V e di variazioni *OPN^{high}* conferiscono un OR=17 (p=0.0007) allo sviluppo della DALD. In un paziente portatore della sostituzione N252S è stato individuato un deficit di attività NK

durante l'infanzia, deficit successivamente superato grazie all'attivazione di qualche meccanismo compensatorio. I pazienti portatori della A91V mostrano un'attività NK ridotta rispetto ai controlli.

ii) Ruolo di *PRF1* in T1DM. Abbiamo tipizzato le variazioni N252S e A91V di *PRF1* in una prima popolazione di 352 pazienti T1DM e 816 controlli e in una successiva seconda popolazione di 365 pazienti e 964 controlli. La frequenza di N252S è risultata significativamente più elevata nei pazienti rispetto ai controlli (popolazione 1: 1.3 vs 0.1%; OR=10.55, 95% CI=2.13-70.82; popolazione 2: 1.8 vs 0.7%, OR=2.67, 95% CI=1.16-6.15), mentre le frequenze di A91V erano simili nei pazienti e controlli. Per valutare il possibile coinvolgimento di altre variazioni, abbiamo poi sequenziato l'intera porzione codificante di *PRF1* in 200 pazienti e 300 controlli. Questa analisi ha permesso l'identificazione di una nuova sostituzione aminoacidica, P477A, presente in un singolo paziente e assente nei controlli. Le due variazioni presenti nei pazienti sembrano causare una riduzione dell'attività NK, in quanto questa è risultata difettiva in tre bambini eterozigoti per la N252S analizzati nella prima infanzia, in un soggetto adulto omozigote per N252S e nel paziente portatore della nuova mutazione P477A.

iii) Ruolo delle varianti *OPN^{high}* in T1DM. Abbiamo tipizzato la variazione +1239 A/C del gene di *OPN*, in grado di distinguere le varianti *OPN^{high}* (+1239C) da quelle *OPN^{low}* (+1239A) in una prima popolazione di 184 pazienti T1DM e 361 controlli e una successiva seconda popolazione di 513 pazienti e 857 controlli. In entrambe le popolazioni la frequenza di soggetti portatori dell'allele +1239C (eterozigoti e omozigoti) è risultata significativamente più elevata nei pazienti rispetto ai controlli (popolazione 1: 39 vs 29%; OR=1.90, 95% CI=1.30-2.78; popolazione 2: 34 vs 28%; OR=1.54, 95% CI=1.23-1.94). L'analisi clinica non ha individuato nessuna differenza tra i pazienti portatori o non portatori dell'allele +1239 C in termini di sesso ed età d'insorgenza della malattia.

Nel complesso questi risultati dimostrano che variazioni nei geni di *PRF1* e *OPN* agiscono come fattori di predisposizione allo sviluppo sia dell'ALPS sia del T1DM.

ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI

- [1] Cappellano G, **Orilieri E**, Comi C, Chiocchetti A, Bocca S, Boggio E, Bernardone IS, Cometa A, Clementi R, Barizzone N, D'Alfonso S, Corrado L, Galimberti D, Scarpini E, Guerini FR, Caputo D, Paolicelli D, Trojano M, Figà-Talamanca L, Salvetti M, Perla F, Leone M, Monaco F, Dianzani U. Variations of the perforin gene in patients with multiple sclerosis. *Genes Immun.* 2008; 9(5): 438-44.
- [2] **Orilieri E**, Cappellano G, Clementi R, Cometa A, Ferretti M, Cerutti E, Cadario F, Martinetti M, Larizza D, Calcaterra V, D'Annunzio G, Lorini R, Cerutti F, Bruno G, Chiocchetti A, Dianzani U. Variations of the perforin gene in patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2008; 57(4): 1078-83.
- [3] Chiocchetti A, Miglio G, Mesturini R, Varsaldi F, Mocellin M, **Orilieri E**, Dianzani C, Fantozzi R, Dianzani U, Lombardi G. Group I mGlu receptor stimulation inhibits activation-induced cell death of human T lymphocytes. *Br J Pharmacol.* 2006; 148(6): 760-8.
- [4] Clementi R, Chiocchetti A, Cappellano G, Cerutti E, Ferretti M, **Orilieri E**, Dianzani I, Ferrarini M, Bregni M, Danesino C, Bozzi V, Putti MC, Cerutti F, Cometa A, Locatelli F, Maccario R, Ramenghi U, Dianzani U. Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function. *Blood.* 2006; 108(9): 3079-84.

INTRODUZIONE

1. AUTOIMMUNITA'

1.1. Etiologia e patogenesi delle malattie autoimmuni

Agli inizi del '900 Paul Ehrlich propose che il sistema immunitario poteva reagire in modo errato dirigendo il proprio attacco contro antigeni autologhi (*self*) invece che contro antigeni estranei, producendo così danni tissutali (*horror autotoxicus*).

Negli anni '60 si riteneva che tutti i linfociti autoreattivi fossero eliminati durante la maturazione linfocitaria e che le malattie autoimmuni fossero l'inevitabile conseguenza di errori nel processo di delezione delle cellule autoreattive negli organi linfatici primari. A partire dalla fine degli anni '70 sono state ottenute numerose evidenze sperimentali in contrasto con questo modello. Infatti, linfociti autoreattivi maturi circolanti sono normalmente presenti anche nei soggetti sani. Poiché la presenza di queste cellule non porta in genere allo sviluppo di manifestazioni autoimmuni, la loro attività deve essere regolata attraverso meccanismi di controllo attivi in periferia (tolleranza periferica). L'alterazione di questi meccanismi di tolleranza può portare all'attivazione di cloni di linfociti autoreattivi e al conseguente sviluppo di reazioni umorali o cellulari contro antigeni *self* che causano lo sviluppo della malattia autoimmune.

Numerosi dati indicano che le malattie autoimmuni sono malattie multifattoriali che si sviluppano in soggetti geneticamente predisposti in seguito all'azione di fattori scatenanti di tipo ambientale.

1.2. Fattori ambientali

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

- i)* La presenza negli agenti infettivi di antigeni simili ad antigeni *self* (fenomeno del “mimetismo molecolare”) può determinare una *cross*-reazione contro il *self* da parte della risposta anti-agente infettivo dopo che quest’ultimo è stato eliminato.
- ii)* L’infezione può danneggiare i tessuti causando la liberazione di antigeni normalmente sequestrati, che non sono mai stati visti dal sistema immunitario e che vengono erroneamente riconosciuti come non *self*.
- iii)* Il processo infiammatorio cronico locale innescato dall’infezione nel tessuto determina la produzione di citochine e l’attivazione delle cellule presentanti l’antigene (APC) aumentandone la capacità di presentare gli antigeni (*self* e *non self*) e le capacità costimolatorie; la presenza di questo ambiente ipereattivo può permettere l’attivazione di linfociti T autoreattivi che non si sarebbero mai attivati in un contesto immunologicamente a riposo.

I meccanismi appena descritti non sono mutualmente esclusivi, ma intervengono insieme e probabilmente ciò determina il fenomeno conosciuto come *epitope spreading*, molto frequente nelle malattie autoimmuni, per il quale nelle fasi iniziali della malattia la risposta autoimmune è diretta verso singoli epitopi di una proteina *self*, mentre in fasi più avanzate la risposta riconosce una molteplicità di epitopi di più proteine diverse.

Dal punto di vista clinico le malattie autoimmuni vengono classificate in sistemiche, come il Lupus Eritematoso Sistemico (LES) e la Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS), e

organo specifiche, come la Sclerosi Multipla (SM), il Diabete Mellito di Tipo 1 (T1DM) e la tiroidine di Hashimoto.

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

Dal punto di vista del meccanismo immuno-patogenetico, 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 LES, 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 un'iperfunzione tiroidea, mentre nella miastenia grave anticorpi contro il recettore dell'acetilcolina inibiscono la trasmissione dell'impulso neuromuscolare. Le malattie autoimmuni cellulo-mediate sono una categoria in continua crescita e sono mediate principalmente da linfociti T *helper* di tipo 1 (Th1), caratterizzati dalla produzione delle citochine proinfiammatorie IL-2, IFN γ e Linfotossina, e da linfociti T citotossici (CTL). Esempi di questo tipo di malattie autoimmuni sono il T1DM oppure la SM in cui i linfociti Th1 e CTL aggrediscono rispettivamente le cellule β del pancreas e la mielina del sistema nervoso centrale. In queste malattie si osserva spesso anche la produzione di autoanticorpi, che sono considerati utili marcatori dello sviluppo della malattia, ma questi sarebbero

conseguenza del fenomeno dell'*epitope spreading* e avrebbero un modesto ruolo patogenetico.

1.3. Predisposizione genetica

Molte malattie autoimmuni presentano un certo grado di familiarità. Questo ha indotto lo svolgimento di numerosi studi volti a definire i fattori genetici coinvolti nel loro sviluppo. Nel loro complesso i dati ottenuti disegnano il quadro tipico delle malattie multifattoriali in cui un insieme di geni diversi possono influire nella suscettibilità genetica allo sviluppo della malattia, che richiede comunque l'induzione da parte di fattori scatenanti.

Molti studi genetici hanno evidenziato l'associazione statistica di malattie autoimmuni con particolari polimorfismi di specifici geni, ovvero è stato dimostrato che una certa malattia autoimmune è più frequente nei portatori di un determinato allele di un certo gene. Tuttavia, spesso non è chiaro se questi geni siano coinvolti direttamente nello sviluppo della malattia oppure se l'associazione statistica sia legata a fenomeni di *linkage disequilibrium*, ovvero al fatto che quell'allele si associa frequentemente ad un particolare allele di un altro gene non noto, posto per lo più in vicinanza al primo e coinvolto direttamente nella genesi della malattia.

Nel complesso, i fattori genetici che sono stati associati con maggiore certezza all'autoimmunità e la cui base biologica sia stata dimostrata in modo soddisfacente sono il sesso e l'aplotipo HLA (antigeni leucocitari umani). A questi si sono più recentemente affiancati fattori genetici in grado di controllare lo spegnimento della risposta immunitaria.

1.3.1. Associazione col sesso

Numerose malattie autoimmuni hanno una diversa frequenza nel sesso femminile e in quello maschile. Molte di esse, come il LES, la miastenia grave, la SM e la sindrome di Sjögren, sono più frequenti nelle donne. Viceversa la spondilite anchilosante è più frequente nei maschi. I motivi di questa diversa suscettibilità non sono noti con certezza, ma è probabile che un ruolo centrale sia giocato dagli ormoni sessuali. Non è chiaro se gli ormoni sessuali steroidei abbiano un'azione diretta sui linfociti, tuttavia questa possibilità è suggerita dal fatto che alcuni steroidi, tra cui il cortisone, hanno un effetto molto potente. Inoltre, alcuni ormoni espressi diversamente nel maschio e nella femmina hanno un effetto sui linfociti. Ad esempio il recettore per la prolattina è espresso sia dai linfociti T sia dai B e la loro risposta a stimoli di attivazione è modulata *in vitro* da questo ormone.

E' noto che gli ormoni sessuali modulano notevolmente la risposta immunitaria durante la gravidanza indirizzando prevalentemente la risposta immune verso risposte di tipo Th2. Questo presenta due vantaggi: *i*) favorisce le risposte anticorpali di tipo IgG, che sono protettive per il feto dal momento che le IgG superano la barriera placentare; *ii*) riduce le risposte cellulo-mediate che potrebbero invece aggredire la placenta, che è un organo *non self*. Infatti, alcune forme di aborto precoce ricorrente sono state attribuite ad un'eccessiva risposta Th1 o citotossica contro la placenta.

In linea con queste osservazioni la gravidanza esacerba alcune malattie autoimmuni mediate da anticorpi (e quindi favorite dai Th2), come il LES, mentre attenua malattie autoimmuni mediate da cellule infiammatorie (e quindi Th1), come la SM e l'artrite reumatoide (AR). E' quindi possibile che la diversa reattività immunitaria condizionata dai diversi livelli di ormoni sessuali possa essere un fattore in grado di influenzare l'insorgenza e l'evoluzione della risposta autoimmune nei maschi e nelle femmine.

1.3.2. Associazione con alleli HLA

Il più noto fattore genetico di predisposizione alle malattie autoimmuni è rappresentato dagli alleli HLA. L'associazione è in genere con alleli di HLA di classe II, anche se in alcuni casi è stata descritta l'associazione con alleli HLA di classe I. Ad esempio, il rischio di sviluppo di T1DM è circa 20 volte maggiore in soggetti che esprimono HLA-DR3 e DR4, rispetto a soggetti che esprimono altri alleli; la probabilità di sviluppare SM è 5 volte maggiore nei portatori di HLA-DR2; quella di sviluppare miastenia grave è 5 volte maggiore nei portatori di HLA-DR3. L'associazione più stretta è però stata osservata nella spondilite anchilosante, il cui rischio di sviluppo è 90 volte superiore in soggetti portatori dell'allele di classe I HLA-B27.

In molti casi è stato dimostrato che questa associazione può essere dovuta all'efficienza con cui le molecole predisponenti "presentano" i peptidi *self* responsabili di quella malattia autoimmune. E' intuitivo, infatti, che gli individui che esprimono molecole HLA capaci di presentare efficientemente i peptidi *self* verso cui si sviluppa una certa risposta autoimmune siano più predisposti allo sviluppo della malattia rispetto a soggetti che esprimono molecole HLA poco efficienti nella presentazione degli stessi.

2. LA SINDROME AUTOIMMUNE LINFOPROLIFERATIVA

2.1. Autoimmunità e difetti genetici ereditari della funzione di Fas

Un fattore genetico ereditario che è stato recentemente chiamato in causa nello sviluppo dell'autoimmunità è il difetto funzionale del sistema Fas/FasL. Fas è un recettore espresso dai linfociti attivati ed è coinvolto nello spegnimento della risposta immunitaria e nella eliminazione di gran parte dei linfociti effettori che si sono espansi nel corso della risposta stessa.

In questo modo si evita l'accumulo dei linfociti nell'organismo in conseguenza delle successive risposte immunitarie cui va incontro l'individuo nel corso della sua vita, e si riduce il rischio che, una volta eliminato l'antigene, i linfociti attivati si indirizzino contro antigeni *self* che presentino somiglianze con gli antigeni *non self* eliminati. E' pertanto intuitivo che se questo sistema non funziona in modo corretto si può verificare un accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari e un aumentato rischio di sviluppare malattie autoimmuni.

2.2. Il modello dei topi MRL lpr e gld

La prima associazione tra autoimmunità e Fas è stata individuata nel modello dei topi di ceppo MRL omozigoti per i caratteri *lpr* (*lymphoproliferation*) e *gld* (*generalized lymphoproliferative disease*), corrispondenti a mutazioni recessive rispettivamente a carico del gene di Fas (cromosoma 19) e di FasL (cromosoma 1) [1].

Topi omozigoti per queste mutazioni (*lpr/lpr* o *gld/gld*) sviluppano un quadro caratterizzato da:

i) linfadenopatia, splenomegalia;

ii) autoimmunità con ipergammaglobulinemia, produzione di autoanticorpi, glomerulonefrite, artrite, vasculite;

iii) espansione policlonale in periferia di linfociti T $\text{TCR}\alpha\beta^+$ privi di CD4 e CD8 (propri dei T *helper* e dei T citotossici, rispettivamente) e per questo detti “doppi negativi” (DN). Essi sono bloccati allo stadio G_0 - G_1 del ciclo cellulare e probabilmente derivano da linfociti T maturi singoli positivi per CD4 o CD8.

Nei topi *lpr* sono state identificate due possibili alterazioni genetiche: una è causata da un difetto di *splicing* e impedisce l'espressione in superficie di Fas (mutazione *lpr*), l'altra è una mutazione puntiforme che colpisce la porzione intracitoplasmatica della molecola (il *Death Domain*) che porta all'espressione di una molecola di Fas incapace di trasmettere il segnale apoptotico alla cellula (mutazione *lpr^{cs}*). I topi *gld* sono invece caratterizzati da una mutazione puntiforme a livello della porzione extracitoplasmatica di FasL con conseguente alterazione del sito di legame con Fas [2].

Il nesso causale tra l'alterata funzione del sistema Fas/FasL e la malattia è stato confermato dall'osservazione che topi *knock-out* per Fas sviluppano un quadro simile a quello dei topi *lpr* e *gld*; inoltre, è possibile correggere il difetto nei topi *lpr* mediante l'espressione della forma *wild type* di Fas [3].

2.3. La sindrome autoimmune linfoproliferativa

Nell'uomo è stata descritta una malattia simile a quella dei topi *lpr* o *gld* denominata Sindrome AutoimmuneLinfoproliferativa (ALPS) [4-9], originariamente nota come Sindrome di Canale-Smith. La malattia si sviluppa in genere in età pediatrica e, come nei topi *lpr* e *gld*, è caratterizzata da:

- i)* ridotta funzionalità di Fas;
- ii)* sviluppo di manifestazioni autoimmuni con associazioni variabili di anemia, trombocitopenia, neutropenia, glomerulonefrite e vasculite;
- iii)* accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari, con linfadenopatie e/o splenomegalia;
- iv)* espansione di linfociti T DN nel sangue periferico [6, 8-10].

Spesso, in aggiunta, sono riscontrabili altre malattie autoimmuni, una storia familiare positiva per l'ALPS e lo sviluppo di linfomi in età adulta [11, 12].

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

Come nel modello murino, anche nei pazienti con ALPS la funzionalità di Fas è ridotta a causa di mutazioni ereditarie deleterie che colpiscono geni coinvolti in questo sistema.

Fino ad oggi sono state identificate varianti dell'ALPS classificate in base al difetto genetico: ALPS-0 caratterizzata da mutazioni in omozigosi nel gene di Fas, che determinano perdita completa dell'espressione di Fas; ALPS-Ia con mutazioni in eterozigosi nel gene di Fas; ALPS-Ib con mutazioni a carico del gene di FasL; ALPS-II con mutazioni a carico del gene di caspasi-10 [8, 13-15]. Tuttavia, resta un'ampia classe di pazienti in cui il difetto genetico non è noto (ALPS-III), a supporto del fatto che altri fattori non ancora noti sono coinvolti nello sviluppo della malattia. Inoltre, recentemente è stata identificata una forma della malattia con

mutazioni a carico del gene di N-Ras, denominata ALPS-IV, la quale non presenta difetti dell'apoptosi mediata da Fas, ma di quella mediata dal mitocondrio [16].

Sia nel topo sia nell'uomo il quadro ALPS non sembra essere rigorosamente monogenico. Nel topo le mutazioni *lpr* e *gld* causano la malattia in omozigosi, ma la loro espressione dipende fortemente dal contesto genetico, tant'è che è molto ridotta nei topi BALB/c rispetto ai topi MRL [17]. Altri fattori complementari sembrano quindi essere richiesti per lo sviluppo della malattia.

Anche nell'uomo la situazione sembra essere simile. Infatti, nell'ALPS esiste una grande variabilità clinica, non solo tra pazienti con mutazioni differenti, ma anche tra pazienti con la stessa mutazione in Fas. Ad esempio nell'ALPS-Ia la maggior parte dei pazienti è eterozigote per la mutazione di Fas, ma questo non è sufficiente per lo sviluppo della malattia in quanto il genitore portatore della mutazione è in genere sano. La possibilità che questo "secondo fattore" necessario per lo sviluppo dell'ALPS abbia basi genetiche è suggerita dal fatto che spesso il secondo genitore (privo di mutazioni in Fas) presenta anch'esso una ridotta funzionalità di Fas. L'espressione della malattia, quindi, potrebbe dipendere dal tipo e dalla gravità delle mutazioni e/o dalla co-presenza di più mutazioni o polimorfismi a carico della via di trasduzione del segnale di Fas [18, 19].

Studi sulle caratteristiche immunologiche dei pazienti con ALPS hanno poi osservato che essi presentano una risposta preferenziale di tipo Th2 con ridotta produzione di IL-2 e IFN- γ e aumentati livelli di IL-4 e IL-5. A questo va aggiunto che in questi pazienti i livelli di IL-10 sono notevolmente aumentati rispetto a quelli di IL-12. IL-10 altera il bilancio Th1/Th2 svolgendo un ruolo da antagonista nello sviluppo dei Th1, favorendo indirettamente la linea Th2 e la crescita di linfociti B con successiva produzione di auto-anticorpi [20].

2.4. *La Malattia Autoimmune Linfoproliferativa di Dianzani (DALD), una variante di ALPS*

Nel nostro laboratorio è stato identificato un gruppo di pazienti con un quadro clinico simile a quello degli ALPS con:

- i)* ridotta funzionalità di Fas;
- ii)* autoimmunità prevalentemente ematologiche;
- iii)* accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari, con linfadenopatie e/o splenomegalia, ma privi della classica espansione di linfociti T DN nel sangue periferico, necessaria per la diagnosi di ALPS [18, 21, 22].

I linfociti T dei soggetti studiati sono resistenti alla morte cellulare indotta da Fas, ma non presentano mutazioni in Fas, FasL o caspasi-10. Inoltre, i linfociti T della maggior parte di questi pazienti sono anche resistenti alla morte cellulare indotta da ceramide, che agisce direttamente sulla via mitocondriale. La componente ereditaria della malattia è suggerita dal fatto che anche i genitori dei pazienti presentano una ridotta funzionalità di Fas (pur in assenza di malattia). Inoltre, la fusione somatica dei linfociti T Fas-resistenti dei pazienti con una linea linfocitaria tumorale Fas-sensibile determina la produzione di cellule ibride Fas-resistenti. Questi dati suggeriscono il coinvolgimento di mutazioni che colpiscono la via di Fas a valle del recettore e determinano la produzione di molecole che esercitano un'attività dominante negativa sulla funzione di Fas.

Questa forma di ALPS “incompleto” è stata denominata DALD (*Dianzani Autoimmune Lymphoproliferative Disease*) da McKusick sul sito OMIM del NIH (riferimento OMIM #605233; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>).

2.5. Coinvolgimento dei difetti funzionali di Fas nello sviluppo di malattie autoimmuni comuni.

L'analisi delle famiglie dei pazienti con ALPS/DALD ha evidenziato un'aumentata incidenza di malattie autoimmuni comuni, quali LES, SM, T1DM o AR in assenza di segni di "linfoproliferazione". Quest'osservazione suggerisce che le alterazioni genetiche alla base della ALPS/DALD possano anche favorire lo sviluppo di malattie autoimmuni comuni. Tale possibilità è stata poi confermata dall'osservazione che una ridotta funzionalità di Fas su base ereditaria è presente anche in circa il 50% dei pazienti con sindrome autoimmune multipla (MAS) (ovvero appartenenti a famiglie con più di un caso di malattia autoimmune entro il secondo grado di parentela) e in sottogruppi di pazienti sporadici con T1DM, SM o autoimmunità tiroidee. In particolare il difetto era particolarmente frequente nei pazienti che presentavano quadri aggressivi di queste autoimmunità [23-25].

3. DIABETE MELLITO DI TIPO 1

Il T1DM è una malattia multifattoriale caratterizzata dalla distruzione delle cellule β nelle isole pancreatiche del Langerhans.

A tutt'oggi il T1DM è distinto in due forme: diabete di tipo 1A (o immunomediato), che origina a seguito della distruzione delle cellule β e che può essere a insorgenza rapida (giovanile) o ad esordio lento (*Latent Autoimmune Diabetes-LADA*, in soggetti adulti) [26-28] e di tipo 1B (o idiopatico), meno frequente, le cui cause non sono ancora note e presente soprattutto in individui con discendenti asiatici o africani [29].

L'eziologia della malattia resta ancora in gran parte sconosciuta, ma i dati epidemiologici sostengono il ruolo determinante sia di fattori ambientali che di fattori genetici [30-32].

La componente genetica, benché fondamentale nello sviluppo del T1DM, non è sufficiente nel determinare l'insorgenza della malattia. E' quindi sempre più verosimile l'ipotesi che l'ambiente possa svolgere un ruolo importante, almeno modulando in senso positivo o negativo l'espressione di fattori genetici predisponenti.

I fattori ambientali di cui è stato proposto un ruolo nell'innescare della risposta autoimmune contro le cellule β comprendono virus (enterovirus, rosolia congenita, coxsackie), tossine (nitrosamine) e alimenti (proteine del latte, cereali, glutine) [33-40].

3.1. Fattori genetici

La predisposizione genetica riveste un ruolo importante nell'eziologia del T1DM, tuttavia la ricerca dei geni di suscettibilità a questa patologia ha dato risultati in parte elusivi.

Sono stati identificati numerosi *loci* associati ad un aumentato rischio di sviluppo della malattia [41-44] ed un ruolo chiave è stato assegnato all'HLA, come descritto in precedenza [41-43].

Altri *loci* di suscettibilità noti coinvolgono il gene dell'insulina, di CTLA-4 (*cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) e di PTPN22 (*tyrosine phosphatase non-receptor type 22*) [41, 42]. Inoltre, un recente studio di associazione *genome wide* condotto su circa 2000 soggetti con T1DM ha suggerito nuovi possibili geni di suscettibilità, tra cui ERBB3 (*receptor tyrosine kinase ErbB3*), SH2B3/LNK (*SH2B adaptor protein 3*), TRAFD1 (*TRAF-type zinc finger domain containing 1*) e PTPN11 (*tyrosine phosphatase non-receptor type 11*) [43, 44]. La maggior parte di questi geni sono correlati con la funzione immunitaria e loro varianti potrebbero favorire lo sviluppo di risposte infiammatorie e immunitarie eccessive, aumentando così il rischio di autoimmunità.

I polimorfismi di suscettibilità del gene dell'insulina cadono in una regione denominata VNTR (*variable number of tandem repeats*) localizzata all'estremità 5' del gene e riconosciuta come il reale *locus* di suscettibilità (IDDM2) [42]. Il numero delle ripetizioni VNTRs (da 30 a 170) hanno un effetto sul livello di espressione del gene dell'insulina; infatti, un basso numero di VNTRs (da 30 a 60 ripetizioni) determinano un'alta espressione del gene nel pancreas ed una bassa espressione nel timo. La bassa espressione dell'insulina nel timo può portare ad un'inefficace distruzione dei timociti autoreattivi durante il processo di selezione timica negativa [42].

PTPN22 e CTLA-4, codificano per regolatori negativi dell'attività linfocitaria. Il gene PTPN22 codifica per una tirosina fosfatasi che inibisce l'attivazione dei linfociti T antigene specifici, attraverso la defosforilazione di componenti essenziali della cascata del segnale del TCR [42].

CTLA-4, recettore dei linfociti T, interagendo con il suo ligando espresso sulla superficie dei linfociti B e delle cellule dendritiche, determina l'inibizione dell'attivazione dei linfociti T [42]. Il ruolo di questi segnali negativi è ampiamente documentato nei topi deficienti per CTLA-4, che tendono a sviluppare linfoproliferazione e infiltrazioni linfoidi in molteplici organi [45]. L'associazione tra polimorfismi nel gene di CTLA-4 e una diminuzione della funzione del recettore ha suggerito un ruolo del gene nello sviluppo del T1DM [46-48]. I polimorfismi di questi *loci* associati al T1DM sono caratterizzati da una perdita di funzione che porta all'iperattività delle cellule T.

La predisposizione genetica al T1DM determinata dal *locus* HLA è legata a specifici polimorfismi delle forme DQ e DR delle molecole MHC di classe II [41, 42, 49]. Alcune combinazioni alleliche per i geni DQA1 e DQB1, definiti DQA1*0501-DQB1*0201, DQA1*0301-DQB1*0302 e gli alleli per il gene DRB1, nominati DRB1*03 e DRB1*04, aumentano in modo significativo il rischio di sviluppare il T1DM. L'omozigosi per uno di questi aplotipi si identifica in circa il 30% dei pazienti con T1DM, ma solo nel 3% della popolazione sana [42]; l'aplotipo DQA1*0102-DQB1*0602 risulta, invece, essere protettivo.

L'effetto del *locus* HLA come fattore di rischio per la malattia è dovuto probabilmente a una presentazione non ottimale degli antigeni *self* ai linfociti *naïve* durante il processo di maturazione nel timo, situazione che condurrebbe a un'inefficace delezione dei linfociti autoreattivi. L'espressione transgenica nel topo degli alleli MHC di classe II di rischio sensibilizza il sistema immunitario nei confronti degli autoantigeni β -cellulari, come ad esempio l'acido glutammico decarbossilasi (GAD65) [50].

3.2. Mediatori della distruzione delle cellule β nel T1DM

I sintomi clinici del diabete compaiono quando più del 70% delle cellule β è ormai distrutta [51]. La forma principale di morte delle cellule β osservata sia nei modelli animali di T1DM sia nelle isole di pazienti con T1DM è l'apoptosi [51, 52]. Non sono ancora completamente chiari i meccanismi di apoptosi delle cellule β , ma probabilmente sono coinvolti: *i*) l'espressione di FasL e del suo recettore Fas espressi rispettivamente sulla superficie dei linfociti T CD8⁺ attivati e delle β cellule pancreatiche; *ii*) il rilascio di perforina e granzimi da parte dei linfociti T CD8⁺ attivati; *iii*) la secrezione, da parte di diverse cellule immunitarie infiltranti le isole, di citochine quali IL-1 β , TNF- α e IFN- γ ; *iv*) la produzione di NO da parte di macrofagi, cellule dendritiche e dalle cellule β stesse [51-53].

Fas e FasL sono espressi rispettivamente sulla superficie delle cellule β e sulle cellule T che infiltrano le isole [54]. Inoltre, è stato dimostrato che l'espressione di Fas è indotta nelle cellule β dei roditori dopo stimolazione con IFN- γ e IL-1 β [54]. L'interazione di Fas con il suo ligando induce l'attivazione della procaspasi-8 che una volta matura attiva la caspasi effettive 3 e/o la via di morte mitocondriale attraverso Bid.

Perforina e i granzimi sono contenuti nei granuli dei CTL [55]. Queste molecole vengono rilasciate nell'ambiente extracellulare attraverso esocitosi, dopo il riconoscimento da parte del TCR di antigeni *self* presentati dalle molecole MHC di classe I sulla superficie delle cellule β . Perforina è in grado formare pori attraverso la membrana plasmatica con un meccanismo Ca²⁺-dipendente. Questi pori permettono l'ingresso dei granzimi all'interno della cellula che attivano caspasi effettrici e Bid. Diversi studi permettono di considerare il sistema perforina/granzimi come importante mediatore della morte delle cellule β indotta dai linfociti T. I topi RIP-LCMV (virus che induce diabete nel modello murino), deficienti per perforina, non sviluppano la malattia dopo infezione con LCMV, mentre i topi NOD (*Non Obese*

Diabetic), deprivati del gene di perforina, sviluppano una grave insulite, ma raramente diventano diabetici [53, 55].

Numerosi dati sperimentali indicano che le citochine secrete dalle cellule infiltranti l'insula diabetica (linfociti Th1 e macrofagi) e, in particolar modo, le citochine proinfiammatorie IL-1 β , TNF- α e INF- γ sono distruttive e possono indurre l'apoptosi della β -cellula. In particolare, IL-1 β da sola o in combinazione con TNF- α e INF- γ induce apoptosi, *in vitro*, di β -cellule di topo e di ratto. Esperimenti effettuati su insule pancreatiche umane utilizzando una combinazione di citochine (IL-1 β + TNF- α + INF- γ), *in vitro*, hanno evidenziato che sia le insule sia le β -cellule purificate presentavano, dopo incubazione di 3–6 giorni, tutte le caratteristiche dell'apoptosi. Le citochine danneggiano la cellula β attivando probabilmente diversi meccanismi cellulari [56]. Questi mediatori, e in particolar modo IL-1 β , inducono l'espressione dell'ossido nitrico sintetasi (iNOS) e la conseguente sintesi di NO e di altri radicali liberi che danneggiano il DNA e quindi la cellula. L'NO, inibendo la sintesi di ATP, sembra essere responsabile della morte per necrosi della β -cellula. Studi *in vitro* hanno evidenziato che sia i macrofagi sia le β -cellule possono essere indotti a sintetizzare NO con conseguente distruzione della β -cellula. Insule di topi privi di iNOS sono più resistenti all'apoptosi di isole di controllo, anche se topi NOD privi di iNOS sviluppano normalmente il diabete. Esperimenti *in vitro* effettuati su isole umane suggeriscono un ruolo marginale del NO nel danno citochino-indotto, anche se questa molecola potrebbe indurre l'espressione di Fas sull' insula diabetica rendendola suscettibile all'attacco T-cellulare. A tale proposito uno studio su insule di ratto mostra che l'espressione di Fas è indotta da IL-1 β e non da INF- γ e che fattori di trascrizione quali NF- κ B e C/EBP hanno un ruolo chiave nella regolazione, da parte delle citochine, del gene di Fas nelle cellule produttrici di insulina. È tuttora quindi dibattuto il ruolo del NO nella morte della β -cellula.

Bcl-2 è una molecola anti-apoptotica appartenente ad una famiglia di geni che ha un ruolo fondamentale nel controllo della morte cellulare programmata [57-59]. Esperimenti effettuati su una linea cellulare pancreatica murina (b-TC1) hanno evidenziato che le citochine IL-1 β , TNF- α e INF- γ inducono apoptosi accompagnata da una diminuzione di espressione della molecola Bcl-2. Inoltre, l'induzione di un'iperespressione di Bcl-2 in b-TC1 proteggeva le stesse dalla morte indotta da citochine. Similmente, la trasfezione di Bcl-2 in β -cellule umane protegge le stesse dal danno indotto da citochine citotossiche. Bcl-2 svolge la sua azione inibendo il rilascio del citocromo-c dal mitocondrio, la successiva attivazione della caspasi-9 e il reclutamento di APAF-1, bloccando la formazione dell'apoptosoma, responsabile dell'attivazione della cascata di caspasi e nucleasi che portano alla frammentazione del DNA e alla morte cellulare.

3.3. Autoantigeni β -cellulari

I principali auto-antigeni identificati nel diabete sono: i) GAD65, ii) IA-2 o IA-2 β , iii) insulina. E' possibile che più di un antigene possa essere coinvolto nelle fasi precoci della malattia [60].

GAD: L'enzima glutammico decarbossilasi (GAD) esiste in due forme codificate indipendentemente da 2 geni localizzati rispettivamente sui cromosomi 10 e 2: il primo codifica per GAD65 di 65 kDa e il secondo per GAD67 di 67 kDa, che differiscono nella sequenza aminoacidica all'estremità N-terminale. Questa proteina è importante nel sistema nervoso centrale dove catalizza la trasformazione dell'acido glutammico in acido γ -aminobutirrico (GABA), neurotrasmettitore inibitore [61]. E' un enzima citoplasmatico, si trova soprattutto nei tessuti nervosi endocrini e ha una regione la cui sequenza aminoacidica è

simile a quella della proteina P-2C del virus Coxsackie B. Quindi un'ipotesi sul suo ruolo patogenico nel T1DM potrebbe coinvolgere il fenomeno del mimetismo molecolare [60].

IA-2/IA-2 β : Il gene per IA-2 si trova sul cromosoma 2q35 e codifica per una proteina di 979 aminoacidi, quello per IA-2 β è situato sul cromosoma 7q36 [62]. IA-2 e IA-2 β , due proteine appartenenti alla famiglia delle tirosinofosfatasi (PTP), rappresentano i maggiori autoantigeni nel diabete. IA-2 β differisce da IA-2 per la mancanza di 388 aminoacidi all'estremità N-terminale e di 65 aminoacidi a quella C-terminale. Vengono espressi nei tessuti neuroendocrini, incluse le insule pancreatiche. Entrambe le proteine sono formate da un peptide segnale, una regione extracellulare di 20 kDa, un dominio transmembrana, una regione citosolica di 42 kDa che include all'estremità C-terminale un dominio PTP di 18 kDa [63]. Gli epitopi riconosciuti dagli autoanticorpi mappano nella regione citosolica e si distribuiscono tra il dominio PTP (79% di omologia tra le due proteine) e il precedente segmento giustapposto alla membrana (*juxtamembrane-JM*) (60% di omologia). Sembrano esserci ampi cambiamenti nella specificità epitopica degli anticorpi durante la progressione della malattia dalla fase pre-clinica a quella post-clinica. Il progressivo ampliamento (*spreading*) della risposta autoimmune ai diversi epitopi delle tirosinofosfatasi, con massima specificità per quello JM, si verifica nella maggioranza dei casi entro i primissimi anni di vita e rappresenterebbe il miglior indicatore indiretto della distruzione autoimmune della β cellula. Ciò suggerisce che probabilmente la regione JM possa contenere qualche epitopo criptico nei confronti del quale è primariamente diretta l'autoimmunità anti-cellula pancreatica e la cui identificazione potrebbe aiutare la prevenzione primaria della malattia [64].

INSULINA: Il gene codificante l'insulina si trova sul cromosoma 11p15. La sequenza di aminoacidi dell'ormone fu stabilita da Sanger nel 1960. Ciò condusse alla sintesi completa della proteina nel 1963 e alla determinazione della sua struttura tridimensionale per opera di Hodgking e collaboratori. Le cellule β degli isolotti di Langerhans sintetizzano l'insulina

partendo da un precursore, la pre-pro-insulina. A livello della membrana del reticolo endoplasmatico si origina la pro-insulina costituita da 3 domini: una catena B N-terminale, una catena A C-terminale e un peptide C di collegamento. Nella conversione della pro-insulina in insulina, 4 aminoacidi basici e il restante peptide di connessione vengono asportati per proteolisi. Questo distacco dà origine alle due catene polipeptidiche A e B che costituiscono la molecola di insulina. La catena A contiene un ponte disolfuro al suo interno (tra gli aminoacidi 6 e 11) e due ponti disolfuro uniscono le due subunità tra di loro. L'insulina è una proteina risultante dalla polimerizzazione di più unità elementari costituite ciascuna da 51 radicali aminoacidici riuniti in due catene polipeptidiche (A e B). Infatti, la catena A è costituita di solito da 21 residui aminoacidici e la catena B da 30. Le due catene dell'insulina formano una struttura altamente ordinata con più regioni ad α -elica sia nella catena A sia nella catena B. Le catene isolate dell'insulina sono inattive [65].

Sebbene la sequenza di aminoacidi dell'insulina si sia conservata in gran parte invariata nel corso dell'evoluzione, essa presenta variazioni importanti tra le specie che spiegano le differenze sia nella potenza biologica sia nell'immunogenicità. Nella maggior parte delle specie esiste un unico gene per l'insulina e un unico prodotto proteico. Fanno eccezione i ratti e i topi che hanno due geni codificanti l'insulina e sintetizzano due molecole che differiscono tra loro per due residui aminoacidici nella catena B [66]. L'insulina svolge essenzialmente due importanti funzioni:

- i)* garantisce il trasporto del glucosio nei vari tessuti dell'organismo;
- ii)* permette la trasformazione del glucosio in glicogeno (glicogenosintesi).

L'insulina in realtà evoca un ampio spettro di risposte biologiche: *i)* promuove il deposito di grasso e di glucosio, convertendoli in trigliceridi, all'interno di cellule bersaglio specializzate; *ii)* influenza la crescita cellulare e le funzioni metaboliche di una grande varietà

di tessuti (fegato, tessuto muscolare e tessuto adiposo); *iii*) interviene nella sintesi proteica e nella sintesi di acidi nucleici [67].

3.4. Autoanticorpi

I principali auto-anticorpi nell'ambito del T1DM sono: *i*) gli anticorpi anti-cellula β pancreatica (ICA) contro aspecifici autoantigeni β cellulari; *ii*) gli anticorpi anti-glutammicodecarbossilasi (GADA); *iii*) gli anticorpi anti-tirosinfosfatasi (IA2A/IA- β A) e *iv*) gli anticorpi anti-insulina (IAA).

Dopo l'inizio della terapia insulinica tali auto-anticorpi a poco a poco diminuiscono e quelli che perdurano più a lungo sono gli anti-GAD che si sono dimostrati positivi, in alcuni casi, perfino dopo 10 anni dalla comparsa del T1DM.

Il rilevamento di anticorpi anti-GAD, anti-IA2 e anti-insulina rappresenta un metodo usato di *routine* per lo *screening*. Essi costituiscono i marcatori principali della fase preclinica del T1DM. In genere, infatti, la presenza degli anticorpi precede di anni lo sviluppo della malattia. La contemporanea presenza di più tipi di autoanticorpi, perdurante nel tempo, ha un alto valore predittivo della malattia. Il loro rilevamento combinato rappresenta il miglior test predittivo nei parenti prediabetici di primo grado di pazienti affetti da T1DM. Infatti, identifica il 90% degli individui a rischio [68].

Gli autoanticorpi caratteristici del diabete presentano alcune regioni geniche V uguali a quelle impiegate per la formazione degli autoanticorpi anti-DNA e del fattore reumatoide espressi nei disordini autoimmuni sistemici [69].

ICA: Gli anticorpi anti-insulina pancreatica sono organo-specifici di classe IgG, identificati per la prima volta nel 1974. Si rilevano tramite test di immunofluorescenza indiretta su sezioni di tessuto pancreatico umano. Da dati riguardanti i marcatori immunologici ottenuti nei parenti

di primo grado di pazienti T1DM si è visto che la presenza di anticorpi ICA ad alto titolo (>20 JDF unità) configura un 40-60% di rischio di T1DM nei successivi 5-7 anni [70].

GADA: Gli anticorpi contro GAD65 sono diretti principalmente contro la porzione centrale (245-449 aminoacidi) e C-terminale (450-585 aminoacidi) della proteina [65].

IA-2A/IA-2βA: Gli anticorpi anti-IA2 rappresentano uno dei più importanti marcatori immunosierologici del T1DM. La presenza di autoanticorpi verso queste proteine si rileva nel 70% di pazienti neodiagnosticati e nei loro parenti di primo grado.

L'anticorpo per la regione JM dell'antigene (IA-2JMA) compare generalmente per primo nei bambini e determinerebbe una più rapida progressione per il diabete (diabete ad insorgenza infantile rispetto a quello del giovane adulto) sia quando presente da solo, ma soprattutto quando eventualmente si verifica il fenomeno dello *spreading* autoanticorpale con la comparsa associata degli autoanticorpi anti-IA-2 e anti-IA-2β. E' stato anche ipotizzato che l'autoanticorpo anti-IA-2JM possa influenzare la processazione dell'antigene determinando un'attivazione delle cellule T con inasprimento e autoperpetuazione della cascata autoimmune anti-cellula β, i cui indicatori indiretti sarebbero proprio gli autoanticorpi anti-IA-2 e anti-IA-2β. Essi reagiscono soprattutto con il dominio intracellulare delle proteine [71]. La maggior parte dei sieri che riconoscono IA-2β riconoscono anche IA-2 ma non viceversa. Perciò gli autoanticorpi anti IA-2β sembrano essere un sottogruppo di quelli anti-IA-2 [62].

IAA: Gli anticorpi anti-insulina hanno un alto valore predittivo per uno sviluppo rapido della malattia conclamata. Sono di classe IgG. La misurazione degli IAA è importante per la diagnosi ma soprattutto per la predizione del T1DM. Infatti, gli IAA sono tra i primi autoanticorpi a comparire. Gli autoanticorpi sono diretti contro epitopi che mappano soprattutto sulla catena B della proteina [72].

4. PERFORINA

4.1. Struttura e funzione

I linfociti citotossici sono in grado di riconoscere cellule infettate da virus o cellule trasformate e di eliminarle attraverso meccanismi perforina-dipendenti e/o utilizzando recettori di morte. Entrambi questi meccanismi rappresentano sistemi fondamentali per l'immuno sorveglianza e l'immuno regolazione.

I granuli dei CTL contengono perforina e altre proteine pro-apoptotiche (granzimi) che vengono secrete insieme al fine di uccidere le cellule bersaglio.

Perforina è una proteina di circa 67 kDa, in grado di formare pori sulla membrana delle cellule bersaglio. L'esocitosi dei granuli citotossici avviene in seguito alla formazione di sinapsi immunologiche tra i CTL e le cellule bersaglio; la fusione dei granuli con la membrana plasmatica si risolve con il rilascio di perforina e serino-proteasi pro-apoptotiche (granzimi) insieme ad altre molecole quali granulosa e chemochine. I granuli inducono poi la morte delle cellule bersaglio tramite meccanismi caspasi-dipendenti e/o caspasi-indipendenti. Inoltre, la sua espressione è regolata durante il differenziamento linfocitario [73] da segnali di recettori di attivazione (recettori delle cellule T, NKG2D) e da citochine (IL-2, IL-15, IL-21).

Il gene umano di perforina, localizzato sul cromosoma 10q22 [74], è costituito da tre esoni, due dei quali (esoni 2 e 3) codificanti la proteina di 555 aminoacidi.

La proteina presenta una sequenza segnale di 21 aminoacidi, seguita da un dominio centrale di circa 300 aminoacidi con forte omologia con la proteina C9 del complemento. Tale regione forma un' α elica anfipatica permettendo alla proteina di inserirsi nel doppio strato lipidico della cellula bersaglio. Gli ultimi 200 aminoacidi di perforina vanno a costituire due domini

già descritti in altre famiglie di proteine: un dominio EGF-like (*Epidermal Growth Factor*) di circa 36 aminoacidi e una regione di circa 130 aminoacidi omologa al dominio C2 della protein-chinasi C [75, 76].

Il dominio C2 all'estremità C-terminale di perforina mostra una stretta omologia di sequenza con il dominio C2 di altre proteine Ca^{2+} -dipendenti coinvolte nel traffico vescicolare o nella trasduzione del segnale [77-79]. Recenti studi hanno dimostrato il ruolo cruciale di questo dominio nella prima fase dell'attività membrano-litica di perforina, la fase di legame alla membrana Ca^{2+} -dipendente [80].

Diversamente dalle altre proteine contenenti un dominio C2, perforina sembra esercitare la sua attività nel compartimento extracellulare, dove la concentrazione di Ca^{2+} libero è alta (> 1 mM). Ne consegue che la proteina necessita almeno di una concentrazione 100uM di Ca^{2+} per legare efficientemente la membrana della cellula bersaglio. La bassa affinità di perforina per il Ca^{2+} potrebbe essere necessaria per proteggere i CTL dall'autolisi durante la sintesi di perforina e il suo traffico all'interno della cellula. Inoltre, l'accumulo di perforina nei granuli, all'interno dei quali il pH viene mantenuto basso (< 5), si risolve nella protonazione dei residui di aspartato all'interno del dominio C2 necessari per legare il Ca^{2+} , non permettendo quindi il legame alla membrana e impedendo l'attivazione di perforina prima della sua esocitosi. La proteina contiene due siti di N-glicosilazione, viene sintetizzata come precursore inattivo, una volta processato all'estremità C-terminale rilascia circa 20 aminoacidi e si trasforma nella sua forma attiva [76].

In seguito alla sua sintesi nel reticolo endoplasmatico rugoso, perforina si sposta attraverso i compartimenti del Golgi dove continua la modificazione post-traduzionale e viene infine impaccata nei granuli litici dei CTL e delle cellule NK.

4.2. Deficit di perforina nella Linfoistiocitosi Emofagocitica Familiare

La linfoistiocitosi emofagocitica familiare (FHL) è una malattia autosomica recessiva che colpisce circa 1/50.000 nati. E' caratterizzata da una sindrome da attivazione macrofagica (definita anche linfoistiocitosi) che insorge di solito dopo un periodo di buona salute, che può durare da alcuni mesi dopo la nascita a, meno comunemente, alcuni anni. La sindrome è di solito scatenata da un'infezione virale. Nella maggior parte dei casi i primi segni comprendono febbre elevata senza causa apparente, irritabilità, malessere generale, edema e epatosplenomegalia. Dal punto di vista biologico possono comparire pancitopenia associata a citolisi epatica, ipertrigliceridemia, fibrinopenia, emodiluzione, alterazioni neurologiche, mentre gli organi viscerali e linfatici sono infiltrati da linfociti e macrofagi attivati che fagocitano globuli rossi. L'emofagocitosi è un elemento caratteristico di questa malattia; il midollo osseo è il sito più comune dell'emofagocitosi, sebbene ne siano affetti frequentemente anche milza, fegato e linfonodi. Quando l'emofagocitosi è prominente nel midollo osseo si ha una diminuzione di precursori emopoietici normali a cui si associa pancitopenia.

Dal punto di vista immunologico, l'attività citotossica dei CTL e delle cellule NK è severamente ridotta. Si assiste a risposte immunitarie incontrollate che comportano infiltrazione e distruzione di tessuti ad opera dei macrofagi attivati e dei CTL. L'attivazione incontrollata dei macrofagi e dei linfociti T comporta il rilascio di citochine pro-infiammatorie che contribuiscono all'emofagocitosi, all'infiltrazione cellulare e al danno d'organo. Il livello di caspasi spontaneamente attivate nei linfociti di pazienti FHL è ridotto e questo può contribuire a rendere elevato il numero di linfociti T attivati [81].

La FHL è geneticamente eterogenea: circa il 10% è associata al cromosoma 9q21-22 (FHL1), il 20-40% al cromosoma 10q21 (FHL2) [82, 83]. Mentre il gene responsabile della FHL1 non è ancora noto, mutazioni del gene di perforina (*PRFI*) (localizzato in 10q21) sono responsabili della forma FHL2 [84]. Recentemente, nel 33% dei pazienti sono state identificate mutazioni nel gene di MUNC13-4 (FHL3) [85]. MUNC13-4, localizzato sul cromosoma 17q25, codifica per una proteina citotossica coinvolta nel meccanismo dell'esocitosi di granuli. Infine, mutazioni nel gene di Sintaxina, che compromettono il rilascio dei granuli citotossici, sono responsabili della FHL4 [86].

Pazienti con FHL2 sono omozigoti o eterozigoti composti per mutazioni di *PRFI*; queste mutazioni (per lo più mutazioni puntiformi e delezioni) comportano una marcata riduzione della funzionalità e della stabilità della proteina che non è più in grado di legare e lisare le cellule bersaglio [87, 88]. La riduzione dell'attività citotossica nei pazienti con FHL2 determina un'attivazione e un'espansione incontrollata dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ ed una eccessiva produzione di citochine infiammatorie [89].

5. OSTEOPONTINA

5.1. Struttura

Osteopontina (OPN) è una glicoproteina acida con un peso molecolare che varia tra 25 e 80 kDa a seguito di processi post-trascrizionali a cui è sottoposta (glicosilazione, fosforilazione e taglio proteolitico ad opera della trombina). E' codificata da un gene multiallelico localizzato nell'uomo sul cromosoma 4q21-25 formato da 7 esoni e 6 introni [90]. La sua espressione è basale e costitutiva nel tessuto epiteliale e osseo, mentre nelle cellule della muscolatura liscia, nei macrofagi e nelle cellule endoteliali è iper espressa a seguito di eventi infiammatori. OPN favorisce *in vitro* l'adesione di linfociti T e macrofagi attivati, mentre *in vivo* provoca l'accumulo di macrofagi nei siti in cui viene iniettata. Non è prodotta dai monociti, ma la sua espressione è rapidamente indotta, quando i monociti vengono differenziati in macrofagi.

OPN possiede la sequenza tripeptidica "Arginina-Glicina-Aspartato" (RGD), caratteristica delle proteine della matrice extracellulare e delle proteine del siero (come la fibronectina, la vitronectina, il collagene e il fibrinogeno) [91]. Tale dominio permette alla proteina di interagire con vari recettori integrinici, come $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ [92-98]; questo legame è inoltre responsabile dei meccanismi di adesione di linfociti T e macrofagi.

Gli effetti di OPN sono mediati da diversi recettori, incluse le integrine sopracitate e isoforme del CD44_{v6-7} [99-104], che mediano la funzione chemotattica di OPN e riducono l'espressione di IL-10 e IL-4; le integrine, invece, mediano l'adesione di cellule B, piastrine, osteoclasti, cellule del muscolo liscio e incrementano l'espressione di IL-12 da parte dei macrofagi; infine, sia le isoforme del CD44_{v6-7} sia le integrine polarizzano comunque le cellule T verso una risposta Th1.

OPN è espressa in diverse forme funzionali prodotte a seguito di *splicing* alternativo, di fosforilazione e glicosilazione, o in seguito a varie scissioni proteolitiche operate da trombina o metalloproteasi della matrice (MMP), soprattutto la MMP-3 e la MMP-7. In particolare i frammenti generati dalla trombina (trombin-OPN) e dalle MMP (MMP-OPN) sembrano acquisire nuove funzioni rispetto alla proteina intera [105-107]. Sono stati identificate tre isoforme di OPN che si generano in seguito a *splicing* alternativo: l'isoforma a (945bp) che codifica per la proteina intera, l'isoforma b (903 bp) che presenta una delezione di 14 aminoacidi nell'esone 5 e l'isoforma c (864bp) che presenta una delezione di 28 aminoacidi nell'esone 4 [108, 109].

5.2. Funzioni

Sono molti i processi fisiologici e patologici in cui OPN sembra coinvolta: i movimenti e la migrazione delle cellule, il rimodellamento vascolare, il riassorbimento osseo, la regolazione della produzione di ossido nitrico (NO) e la formazione di metastasi tumorali [110, 111]. Inoltre, OPN è coinvolta nell'infiltrazione macrofagica e linfocitaria in risposta a diversi stimoli patologici *in vivo*, è espressa da istiociti nei granulomi di varia provenienza (inclusa tubercolosi e sarcoidosi) [112] ed è direttamente coinvolta nella formazione e nella calcificazione delle placche aterosclerotiche [113]. OPN si comporta da citochina favorendo le risposte di tipo Th1 e inibendo quelle di tipo Th2 [114-116].

Nel topo OPN, in presenza di lipopolisaccaride, induce da parte dei macrofagi la produzione di IL-12 ed inibisce la produzione di IL-10. Topi *knock-out* per OPN presentano una ridotta risposta di tipo Th1, legata ad una ridotta produzione di IL-12 e ad un'aumentata produzione di IL-10 [100, 114, 117-122].

5.3. Ruolo nell'autoimmunità

I ruoli svolti da OPN nello sviluppo di autoimmunità nell'uomo sono molteplici: OPN stimola, infatti, i linfociti T a differenziarsi, proliferare e aumenta la loro espressione di INF- γ e CD40L con conseguente aumentata espressione di IL-12 da parte dei linfociti B [114]. Recentemente è stato dimostrato che OPN induce sopravvivenza dei linfociti T attivati, attraverso la regolazione dei fattori di trascrizione Foxo3a (*forkhead box O3*) e NF κ B (*nuclear factor-kappa B*) [123].

Lo studio svolto su topi transgenici che producono elevati livelli di OPN (OPN^{+/+}) ha evidenziato un accumulo nella cavità peritoneale di linfociti B1, ipergammaglobulinemia e produzione di autoanticorpi anti-DNA [124].

Il possibile ruolo di OPN nelle malattie autoimmuni è suggerito da varie osservazioni. Ad esempio le lesioni di pazienti SM presentano elevati livelli di OPN e topi *knock-out* per OPN sviluppano una forma attenuata di EAE (encefalomielite autoimmune sperimentale), modello sperimentale della SM, rispetto al topo *wild-type* [123, 125, 126]. Nell'AR l'espressione di OPN è elevata nei fibroblasti, nei macrofagi e nei liquidi sinoviali, dove inibisce la produzione di NO e prostaglandina E₂; inoltre il topo *knock-out* per OPN è relativamente protetto dall'AR [127].

SCOPO GENERALE DELLA TESI

Scopo di questa tesi era l'identificazioni di nuovi fattori genetici predisponenti per ALPS e di valutare il ruolo di questi fattori nello sviluppo di T1DM.

La ricerca di nuovi fattori genetici è partita dalla iniziale osservazione di un paziente con ALPS-Ia che era portatore di una mutazione eterozigote nel gene di Fas e di una seconda mutazione eterozigote nel gene di perforina [128]; il fatto che le due mutazioni erano state ereditate da genitori distinti, entrambi sani, suggeriva che la loro co-trasmissione al figlio avesse avuto un ruolo nello sviluppo dell'ALPS. L'interesse del dato era aumentato dal fatto che mutazioni bialleliche nel gene di perforina causano la FHL, che a sua volta presenta aspetti di linfoproliferazione [129, 130]. Questa osservazione ci ha spinto ad un'analisi sistematica del gene di perforina nei pazienti con ALPS/DALD per valutare se variazioni di questo gene possano avere un ruolo generale nello sviluppo di tale malattia (**articolo 1**). Poiché questo studio ha evidenziato che variazioni di *PRF1* possono essere un fattore predisponente per lo sviluppo di ALPS/DALD, abbiamo poi valutato se esse possano anche favorire lo sviluppo di altre malattie autoimmuni come T1DM (**articolo 2**). Infine, dal momento che questo studio ha dimostrato che variazioni di *PRF1* possono anche favorire lo sviluppo di T1DM, abbiamo valutato se lo stesso effetto si verifici anche per opera delle variazioni *OPN^{high}* del gene di osteopontina (**articolo 3**), che abbiamo in passato associato allo sviluppo di ALPS/DALD. Quest'ultimo lavoro ha quindi dimostrato che, anche in questo caso, le varianti *OPN^{high}* predispongono anche allo sviluppo di T1DM.

ARTICOLO 1

RIASSUNTO

Perforina è una proteina coinvolta nella citotossicità cellulo-mediata, che rappresenta un meccanismo fondamentale per l'eliminazione delle cellule infettate da virus, ma è anche coinvolto nello spegnimento della risposta immunitaria attraverso l'uccisione di cellule immuni attivate. Mutazioni bialleliche di *PRFI* causano la FHL, una malattia ereditaria caratterizzata da aspetti linfoproliferativi. Questo lavoro parte dall'osservazione di un paziente con ALPS-Ia che era portatore di una mutazione eterozigote nel gene di Fas e di una seconda mutazione eterozigote nel gene di perforina [128]; il fatto che le due mutazioni erano state ereditate da genitori distinti, entrambi sani, suggeriva che la loro co-trasmissione al figlio avesse avuto un ruolo nello sviluppo dell'ALPS. Per valutare se variazioni di *PRFI* possano essere un generale fattore predisponente per lo sviluppo di ALPS/DALD, quando associate ad un difetto funzionale di Fas, il gene è stato sequenziato in 14 pazienti con ALPS, 28 con DALD e 816 controlli; sono state identificate due variazioni aminoacidiche: la sostituzione N252S è stata individuata in 2 pazienti ALPS e la sostituzione A91V in 6 pazienti DALD. La variazione N252S è risultata significativamente più frequente nei pazienti ALPS rispetto ai controlli (7.1% vs 0.1%; $p=0.0016$) conferendo un OR=62.7 (95% CI: 6-654.9); la variazione A91V è risultata significativamente più frequente nei pazienti DALD rispetto ai controlli (12.5 % vs 4.6%, $p=0.016$) conferendo un OR=3 (95% CI: 1.2-7.1). La co-presenza della variazione A91V e di variazioni *OPN^{high}* conferiscono un OR=17 ($p=0.0007$) allo sviluppo della DALD. In un paziente portatore della sostituzione N252S è stato individuato un deficit di attività NK durante l'infanzia, deficit successivamente superato grazie all'attivazione di

qualche meccanismo compensatorio. I pazienti portatori della A91V mostrano un'attività NK ridotta rispetto ai controlli.

Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function

Rita Clementi, Annalisa Chiochetti, Giuseppe Cappellano, Elisa Cerutti, Massimo Ferretti, Elisabetta Orilleri, Irma Dianzani, Marina Ferrari, Marco Bregni, Cesare Danesino, Valeria Bozzi, Maria Caterina Putti, Franco Cerutti, Angela Cometa, Franco Locatelli, Rita Maccario, Ugo Farneghi, and Umberto Dianzani

Mutations decreasing function of the Fas death receptor cause the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) with autoimmune manifestations, spleen/lymph node enlargement, and expansion of CD4/CD8-negative T cells. Dianzani Autoimmune Lymphoproliferative Disease (DALD) is a variant lacking this expansion. Perforin is involved in cell-mediated cytotoxicity and its biallelic mutations cause familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH). We previously described an ALPS patient carrying het-

erozygous mutations of the Fas and perforin genes and suggested that they concurred in ALPS. This work extends the analysis to 14 ALPS, 28 DALD, and 816 controls, and detects an N252S amino acid substitution in 2 ALPS, and an A91V amino acid substitution in 6 DALD. N252S conferred an OR = 62.7 ($P = .0016$) for ALPS and A91V conferred an OR = 3 ($P = .016$) for DALD. Copresence of A91V and variations of the osteopontin gene previously associated with DALD conferred an OR = 17 ($P = .0007$) for DALD.

In one N252S patient, NK activity was strikingly defective in early childhood, but became normal in late childhood. A91V patients displayed lower NK activity than controls. These data suggest that perforin variations are a susceptibility factor for ALPS/DALD development in subjects with defective Fas function and may influence disease expression. (Blood. 2006;108:3079-3084)

© 2006 by The American Society of Hematology

Introduction

Fas is a death receptor belonging to the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily and induces cell death upon triggering by FasL.¹⁻³ In the immune response, it is highly expressed by activated effector lymphocytes and is involved in switching off the immune response, limiting clonal expansion of lymphocytes, and favoring peripheral tolerance. Moreover, FasL is expressed by cytotoxic T cells and NK cells and is involved in killing of target cells expressing Fas. Fas induces cell apoptosis by triggering a cascade of caspases through 2 partly interconnected pathways: the extrinsic pathway involves caspase-8-mediated direct activation of the cascade, whereas the intrinsic pathway proceeds through mitochondrial release of cytochrome c and activation of caspase-9. Both pathways converge in the activation of effector caspases, such as caspase-3, -6, and -7.¹⁻³

Defective Fas function leads to the unwanted accumulation of lymphocytes and favors autoimmunity possibly by impairing the switching off of autoreactive lymphocytes. This has been shown in the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS), an inherited disease characterized by (1) defective function of Fas, (2) autoimmune manifestations that predominantly involve blood cells, (3) polyclonal accumulation of lymphocytes in the spleen and lymph nodes with lymphadenomegaly and/or splenomegaly, and (4) expansion of TCR $\alpha\beta$ + CD4/CD8 double-negative (DN) T

cells in the peripheral blood. Moreover, ALPS patients are predisposed to develop lymphomas in adulthood.³⁻¹¹ ALPS is generally due to deleterious mutations of the Fas gene (*TNFRSF6*) and is classified as ALPS type-Ia, but rare mutations of other genes have been detected, for instance, the FasL genes in ALPS-Ib, and the caspase-10 gene in ALPS type-IIa, whereas the mutated gene is not known in other patients. Mutations of the Fas and the FasL gene detected in MLR *lpr/lpr* and *gld/gld* mice, respectively, give rise to a disease that overlaps ALPS. We described an ALPS variant that fulfills the first 3 criteria but lacks expansion of DN T cells and mutations of the Fas, FasL, or caspase-10 genes.^{12,13} Since the complete paradigm of ALPS could not be demonstrated, this disease has been provisionally named Dianzani Autoimmune Lymphoproliferative Disease (DALD) by McKusick (OMIM reference #605233; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>).

ALPS-like disorders do not behave as classic monogenic diseases.³⁻⁴ This is true in *lpr/lpr* and *gld/gld* mice and even more evident in ALPS and DALD. The *lpr* and *gld* mutations cause the disease in homozygosity, but its expression greatly depends on the genetic background, since it is much milder in BALB/c than in MLR mice. Most ALPS type-Ia patients are heterozygous for the Fas mutation, but the parent carrying the mutation is generally healthy. Other complementary factors may thus be required in

From the Pediatric Hematology-Oncology, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) Policlinico San Matteo, University of Pavia, Pavia, Italy; Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD) and Department of Medical Sciences, "A. Avogadro" University of Eastern Piedmont, Novara, Italy; Laboratory of Tumor Immunology and Department of Oncology, Scientific Institute H. S. Raffaele, Milano, Italy; Division of Hematology-Bone Marrow Transplantation, Scientific Institute H. S. Raffaele, Milano, Italy; Department of Biology and Medical Genetics, University of Pavia and IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy; Pediatric Hematology-Oncology, Department of Pediatrics, University of Padua, Padova, Italy; and Department of Pediatrics, University of Turin, Torino, Italy.

Submitted February 3, 2006; accepted May 9, 2006. Prepublished online as Blood First Edition Paper, May 23, 2006; DOI 10.1182/blood-2006-02-001412.

R.C. and A.C. contributed equally to this work.

Reprints: Umberto Dianzani, IRCAD-Department of Medical Sciences, Via Solaroli 17, I-28100, Novara, Italy; e-mail: umberto.dianzani@med.unipmn.it.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2006 by The American Society of Hematology

function of the severity of the mutation.¹⁴ The same observation is true in DALD patients, since both parents generally display defective Fas function, but are healthy.¹³ We suggested that a concurrent factor may be production of high levels of osteopontin (OPN), a cytokine involved in inflammation that inhibits activation-induced cell death (AICD) of lymphocytes. We found that DALD patients display increased frequency of polymorphic variants of the OPN gene (OPN^{99b} gene variants) that cause increased production of OPN by stabilizing its mRNA and increase the risk of DALD by about 8-fold.^{15,16}

A second concurrent factor may be inherited alterations of the perforin gene (*PRF1*) that decrease the function of this protein, which is stored in the lytic granules of cytotoxic cells and plays a crucial role in cell-mediated cytotoxicity by forming pores in the target-cell membrane.¹⁷ Biallelic mutations of *PRF1* cause about 30% of cases of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH), a rare life-threatening immune deficiency ascribed to decreased capacity of CD8+ T cells and NK cells to kill virus-infected cells.¹⁷⁻²² A further 25% of patients display mutations of the *MUNC13-4* gene involved in perforin storage in the lytic granules and exocytosis.²³ HLH is a recessive disease and subjects carrying heterozygous *PRF1* mutations are generally healthy.

We have identified a heterozygous mutation of *PRF1* in an ALPS patient who also carried a heterozygous mutation of the Fas gene. Since these mutations were inherited from distinct parents who were healthy, we suggested that their cotransmission was responsible for the son's ALPS.²⁴

Systematic evaluation of the role of *PRF1* in ALPS was not undertaken on that occasion. The present study has thus been performed to extend the analysis of *PRF1* to a larger number of patients and evaluate its role in the development of ALPS and DALD.

Patients, materials, and methods

Patients

We analyzed 14 ALPS and 28 DALD Italian patients (some have already been presented in Dianzani et al,¹² Ramenghi et al,¹³ and Campagnoli et al²⁵). Diagnosis of ALPS was based on the presence of all the following criteria: (1) autoimmune manifestations; (2) chronic nonmalignant lymphadenopathy (2 or more lymph nodes enlarged over 2 cm in diameter) and/or splenomegaly; (3) defective Fas-induced apoptosis *in vitro*; and (4) mutations in the Fas, FasL, or caspase-10 genes and/or expansion of DN T cells in the peripheral blood. The Fas, FasL, caspase-10, and OPN genes were sequenced from genomic DNA, as previously reported.^{12,13} Seven ALPS patients (patients 1-7) carried heterozygous mutations of the Fas gene.

Diagnosis of DALD was based on the presence of the first 3 criteria, but lack of the fourth one. Two DALD patients (DALD-2 and -24) carried a heterozygous variation of the caspase-10 gene, causing a V410I amino acid substitution, initially associated with ALPS in homozygosity,¹⁹ but then recognized as a polymorphism.^{25,26}

No patients displayed the diagnostic criteria for HLH. Controls (n = 816) were ethnically matched, healthy individuals. All patients and controls were unrelated, white and Italian. Peripheral-blood specimens and serum were obtained from patients and healthy controls with written informed consent, which was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was performed according to the guidelines of the local ethics committee of the Ospedale Maggiore di Novara (Novara, Italy).

Flow cytometry

Analysis of lymphocyte subpopulations in peripheral-blood mononuclear cells (PBMCs) was performed by direct immunofluorescence and flow cytometry. Perforin expression was evaluated in fixed and permeabilized cells (Cytofix-Cytoperm; BD Pharmingen, San Diego, CA) using a

phycoerythrin (PE)-conjugated antiperforin antibody (BD Pharmingen) and flow cytometry.

Fas function assay

Fas-induced cell death was evaluated as previously reported on T-cell lines obtained by activating PBMCs with phytohemagglutinin at days 0 (1 μ g/mL) and 15 (0.1 μ g/mL) and cultured in RPMI 1640 + 10% fetal calf serum (FCS) + rIL-2 (2 U/mL) (Biogen, Geneva, Switzerland). Fas function was assessed 6 days after the second stimulation (day 21).^{12,13} Cells were incubated with control medium or anti-Fas MAbs (CH11, IgM isotype) (1 μ g/mL) (UBI, Lake Placid, NY) in the presence of rIL-2 (1 U/mL) to minimize spontaneous cell death. Cell survival was evaluated after 18 hours by counting live cells in each well by the trypan blue exclusion test and by flow cytometry of cells excluding propidium iodide and unstained by annexin V-FITC; the 2 methods gave overlapping results. Assays were performed in duplicate. Cells from 2 healthy donors were included in each experiment as positive controls. Results were expressed as specific cell-survival percent, calculated as follows: (total live-cell count in the assay well/total live-cell count in the control well) \times 100.

Fas function was defined as defective when cell survival was less than 82% (the 95th percentile of data obtained from 200 healthy controls).

Amplification of *PRF1* and mutation detection

Genomic DNA was isolated from PBMCs, and exon 2 and 3 of the perforin coding region were amplified in standard polymerase chain reaction (PCR) conditions. The primers used for amplification have been previously described. PCR products were purified with the EXO/SAP kit.²⁴ Sequencing was performed with the ABI PRISM BigDye Terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) on an automatic sequencer (Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer) according to the manufacturer's instructions with the amplification primers plus 2 internal primers (forward 5'-CAGGTCAACATAGGCATCCACG-3'; reverse 5'-GAACAGCAG-GTCGTTAATGGAG-3') for exon 3. OPN gene variants were typed as previously reported.¹⁵

Cytotoxicity assays

NK activity of PBMCs was assessed by a standard 4-hour ⁵¹Cr release assay with K562 cells as the target. Results are expressed as specific lysis percent calculated as follows: (sample ⁵¹Cr release-spontaneous release)/(maximal release-spontaneous release) \times 100.

Statistical analysis

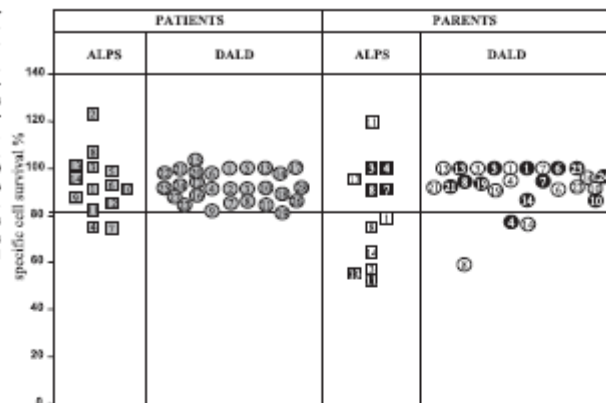
Comparisons of NK activity, perforin expression, and NK-cell distribution were performed with the nonparametric Mann-Whitney *U* test. Genotype distributions were analyzed with the χ^2 test or the Fisher exact test as reported. All *P* values are 2-tailed, and the significance cut-off was *P* below .05.

Results

The work involved 14 patients with ALPS and 28 with DALD. Both groups displayed autoimmune manifestations, lymphadenopathy and/or splenomegaly, and defective Fas function; ALPS patients alone also displayed mutations of the Fas gene and/or peripheral-blood expansion of DN T cells. Figure 1 shows Fas function of T cells from all patients and available parents. That of ALPS-4 and -7 was borderline, but they were included in the ALPS group because they also carried a Fas gene mutation and expansion of DN T cells. Most parents, too, displayed defective Fas function.

The coding region of *PRF1* was sequenced from genomic DNA in all patients and 816 random controls in the search for variations previously associated with HLH. Only 2 HLH-associated missense variations were detected, a C/T substitution in position 272 of the cDNA (nomenclatures are referred to cDNA clone M28393,

Figure 1. Fas-induced T-cell death in patients with ALPS or DALD and several of their parents. Data from ALPS patients' families are marked with squares, those from DALD patients' families with circles; gray symbols mark patients; black symbols, the fathers; and white symbols, the mothers. Numbers correspond to the code assigned to each patient. Long-term T-cell lines were treated with anti-Fas Mab, and survival was assessed after 18 hours. Results are expressed as relative cell-survival percent. The horizontal lines indicate the upper limit of the normal range, calculated as the 95th percentile of data obtained from 200 healthy donors (median cell survival of controls was 80%; the 5th-95th percentile range was 38%-82%). In the control wells (ie, in the absence of apoptotic stimuli), spontaneous cell loss was always less than 10% of the seeded cells and similar in cultures from the patients and healthy donors. ALPS patients 1 to 7 carried heterozygous mutations of the Fas gene.



ΔTG = +1) and an A/G substitution in position 755, which caused an A91V and an N252S amino acid substitution at the protein level, respectively. The genotypic distributions of these variations did not deviate significantly from the Hardy-Weinberg equilibrium in either group.

The N252S substitution was found in 2 ALPS patients (ALPS-5 and ALPS-11), 2 controls, and no DALD patients. The overall genotype distributions (Table 1) were significantly different in ALPS and controls ($P = .0016$). The N252S allelic frequency was significantly higher in the ALPS patients (7.1% vs 0.1%, $P = .0016$) and conferred an OR = 62.7 (95% CI: 6-654.9). This variation had been previously reported by some of us in ALPS-5.²⁴

The A91V variation was carried by 6 DALD patients only: it was heterozygous in 5 (DALD-3, -6, -9, -14, -25) and homozygous in one (DALD-10). Moreover, it was detected in 72 controls: heterozygous in 69 and homozygous in 3. The overall genotype distributions (Table 1) were significantly different in DALD and controls ($P = .01$). The A91V allelic frequency was significantly

higher in the DALD patients (12.5% vs 4.6%, $P = .016$) and conferred an OR = 3 (95% CI: 1.2-7.1).

Four other nucleotide variations were detected, but were not further evaluated since they did not change the amino acid nor influence the splicing sites. Two (C822T and T900C) had been previously reported as common polymorphisms not associated with HLH. Their frequency was similar in the patients and the controls. The other 2 (G435A and A462G) were in perfect linkage disequilibrium with the A/G substitution in position 755 (N252S) and were in fact only detected in the 4 subjects carrying this variation.

We had previously found that DALD development is favored by the 282C-750T-1083A-1239C and 282C-750T-1083G-1239C single nucleotide polymorphism haplotypes of the OPN gene (*OPN*^{9a} gene variants).¹⁵ To determine whether *PRF1* and *OPN* variations have a cooperative effect on ALPS/DALD development, we typed the *OPN* gene in all patients and 134 controls and evaluated the frequency of copresence of the *PRF1* and *OPN* genotypes conferring susceptibility to ALPS/DALD (Table 1). Copresence was displayed by 6 (2.4%) of 28 DALD patients, but only 3 (2.2%) of 134 controls, and increased the risk of DALD by 17-fold relatively to the absence of both factors (OR = 17; 95% CI: 2.7-122; $P = .0007$) and by 9-fold relatively to the presence of only one (OR = 8.8, 95% CI: 1.7-50.5; $P = .004$). By contrast, this cooperation was not detected in ALPS patients since none of them carried both factors.

We had previously shown that ALPS-5 carried a heterozygous mutation of the Fas gene.²⁴ His *PRF1* N252S variation was inherited from the mother, whereas the Fas mutation also was carried by the father and a brother, and cosegregated with defective Fas function (Figure 2A). Since all 3 relatives were healthy, we suggested that co-inheritance of the Fas and perforin gene variations played a role in ALPS development in this patient. The mutated gene was not known in ALPS-11, and his inheritance pattern was determined by analyzing Fas function and sequencing *PRF1* in his parents. N252S was carried by his father only, whereas Fas function was defective in his mother only (Figure 2A). Once again, therefore, Fas and perforin alterations were inherited from different parents, who were both healthy. These data indicate that association of defective Fas function with the N252S variation strongly favors ALPS development.

A family analysis also was conducted for 3 DALD patients carrying the A91V variation (DALD-3, -6, -10, Figure 2B). In

Table 1. Frequency distribution of the A91V and N252S *PRF1* variations and the *OPN*^{9a} genotypes in 14 ALPS and 28 DALD patients

Genotypes according to variation	ALPS*		DALD†		Controls	
	N	%	N	%	N	%
<i>PRF1</i> N252S						
NN	12	85.7	28	100	814	99.8
NS	2	14.3	0	0	2	0.2
SS	0	0	0	0	0	0
<i>PRF1</i> A91V						
AA	14	100	22	78.5	744	91.2
AV	0	0	5	17.9	89	8.4
VV	0	0	1	3.6	3	0.4
<i>PRF1</i> and <i>OPN</i> susceptibility genotypes‡						
None	4	28.6	8	21.4	51	38.1
<i>PRF1</i> alone	2	14.3	0	0	10	7.5
<i>OPN</i> alone	8	57.1	16	57.2	70	52.2
<i>PRF1</i> + <i>OPN</i>	0	0	8	21.4	3	2.2

*The overall genotypic distribution of N252S was significantly different from controls ($P = .0016$, Fisher exact test).

†The overall genotypic distribution of A91V was significantly different from controls ($P = .01$, Chi square test); frequency of *PRF1*+*OPN* susceptibility genotypes was significantly higher than in controls ($P = .0009$, Fisher exact test).

‡Genotypes with the N252S (in ALPS) or A91V (in DALD) *PRF1* variations (either homozygous or heterozygous) and/or the 282C-750T-1083A-1239C or 282C-750T-1083G-1239C *OPN*^{9a} haplotypes.

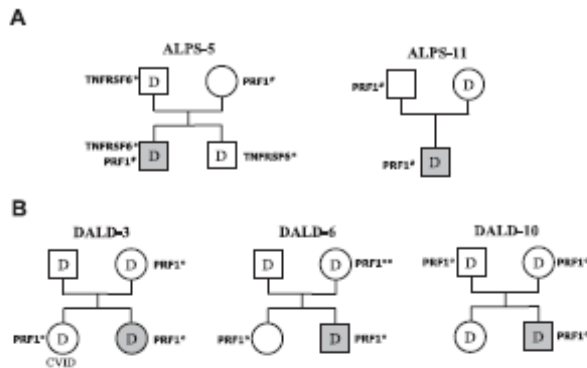


Figure 2. Pedigrees of patients ALPS-5 and -11 and DALD-3, -6, and -10. (A) Inheritance of the N252S PRF1 mutation (PRF1*) and defective Fas function (D) in ALPS-5 and -11; inheritance of the Fas mutation (TNFRSF6*) is also shown for ALPS-5. **(B)** Inheritance of the A91V PRF1 variation (PRF1*) and defective Fas function (D) in the 3 DALD patients. Subjects with ALPS/DALD are marked in gray; the sister of DALD-3 displayed CVID. PRF1** marks A91V homozygotes. Fas function was evaluated as reported in Figure 1.

DALD-3's family, Fas function was defective in both parents and the sister, whereas A91V was carried by the mother and the sister; both parents were healthy, whereas the sister presented common variable immune deficiency (CVID). Intriguingly, DALD-3 also developed hypogammaglobulinemia some years after disease onset. In DALD-6's family, Fas function was defective in both parents, whereas A91V was carried by the mother (homozygous) and the sister; all these relatives were healthy. In DALD-10's family, Fas function was defective in both parents and the sister, whereas A91V was carried by both parents; all these relatives were healthy. Analysis of the OPN gene showed that all subjects in these 3 families also carried the OPN^{Ms3} gene variants (data not shown). Association of defective Fas function and the A91V variation is thus not sufficient to induce DALD, even in the presence of the OPN susceptibility alleles, since 4 of 8 subjects with this association were healthy.

To assess whether N252S and A91V correlated with altered function and/or expression of perforin, NK activity was evaluated by a standard ⁵¹Cr-release assay and perforin expression by flow cytometry in 5 patients: ALPS-5 and -11 with N252S, and DALD-3, -6, and -10 with A91V. Perforin expression was slightly decreased in ALPS-5, DALD-6, and DALD-10, but normal in the

other subjects, whereas the proportion of NK cells, detected as CD3⁻CD56⁺ or CD3⁻CD16⁺ cells, was in the normal range in all subjects. NK activity was significantly lower in the patients with A91V than in the controls ($P = .015$), but not decreased in those with N252S (Table 2). However, in ALPS-11, previous analyses showed that NK activity was almost undetectable at the age of 3 (ie, at diagnosis), extremely low but detectable at the age of 5, and normal at the age of 12 (Table 2). In ALPS-5, NK activity was assessed at the age of 30, and no previous analyses were available.

Discussion

This paper follows a description of an ALPS patient (ALPS-5) with variations of both the Fas gene and PRF1.²⁴ It shows that his N252S variation is significantly more frequent in ALPS patients than in healthy controls. Moreover, the frequency of a second HLH-associated PRF1 variation, A91V, is significantly increased in DALD patients, who display an incomplete ALPS pattern. N252S was detected in 2 of 14 ALPS patients (ALPS-5 and -11). It increased susceptibility to ALPS by about 63-fold and was found only in 2 of 816 ethnically matched controls, as in other studies.²⁷

Table 2. NK activity, perforin expression, and proportion of NK cells in PBMCs of ALPS/DALD patients carrying the N252S and A91V perforin variations

Subjects according to PRF1 variation*	Effector-target ratios for NK activity†			Perforin expression‡		Peripheral-blood NK cells, %	
	100:1	30:1	10:1	%	MFI	CD3 ⁻ CD16 ⁺	CD3 ⁻ CD96 ⁺
N252S							
ALPS-5	58	49	38	8§	9§	11	16
ALPS-11 (12 years)	35	26	18	24	50	13	15
(5 years)	7§	4§	2§	nd	nd	nd	nd
(3 years)	3§	1§	0§	nd	nd	nd	nd
A91V							
DALD-3	13	12	3	45	62	8	8
DALD-6	28	12	3	15§	61	13	13
DALD-10	18	11	4	36	17§	9	13
Median	18	12	3	36	61	9	13
Controls	31 (13-56)	23 (8-35)	12 (2-31)	23 (17-26)	47 (28-74)	11 (5-31)	17 (4-27)

nd indicates not determined.
 *All patients were heterozygous for the indicated variation except for DALD-10, who was homozygous.
 †NK activity is expressed as specific cell lysis percent, and § is the mean of triplicate assays, whose standard deviation was always < 10% of the mean. Spontaneous cell lysis was always < 10% of maximal cell lysis.
 ‡Perforin expression is shown as percentage of positive cells and mean fluorescence intensity (MFI) in arbitrary units.
 §< 5th percentile of controls.
 ¶Median (5th-95th percentile range) from 10 controls. The NK activity of these DALD patients was significantly lower than that of the controls ($P = .015$, Mann-Whitney test).

N252S occurs within the membrane-attack-complex, a region critically involved in the pore-forming activity of perforin, but its functional significance has been debated since it has been associated with normal NK activity^{17,28,29} as in both ALPS-5 and -11 at the time of this study. The finding that ALPS-11 displayed a striking defect of NK activity when he was 3 and 5 years old suggests that N252S is here associated with other factors decreasing NK function in early childhood, followed by normalization on the part of unknown compensatory mechanisms.

A91V was detected in 6 of 28 DALD patients. It increased susceptibility to DALD by 3-fold and was relatively frequent (4.6%) in the controls, as in other studies.^{27,30,31} This variation decreases perforin function by altering its conformation, decreasing its cleavage to the active form and increasing its degradation.²⁸⁻³⁰ In line with this view, our patients displayed lower NK activity than the controls, especially at low effector-to-target ratios.

These data suggest that some PRF1 variations that cause HLH when combined with a second PRF1 variation may favor ALPS/DALD development if inherited defects hitting Fas function also are present. Fas function is normal in HLH and hence is not a contributory of this disease.²¹

The family analyses showed that combination of A91V with the Fas defect was not sufficient to induce DALD since several healthy family members carried both alterations. This risk was significantly increased by copresence of the OPN^{H2H} gene variants, but even their combination with A91V and the Fas defect was not sufficient to induce DALD in 4 of 8 DALD family members. Combination of N252S with the Fas defect seems to have a stronger effect than A91V, since we found it in patients only. However, even this combination may not be sufficient for ALPS development, since Rieux-Laucat et al²² have described an ALPS patient and his healthy father carrying both N252S and a Fas gene mutation. The observation that N252S is in perfect linkage disequilibrium with G435A and A462G raises the possibility that these variations or others included in the ancestral haplotype play a role in ALPS development. A second possibility is that concurrent roles are

played by other factors. The fact that OPN did not cooperate with N252S in ALPS development may be related to the stronger effect displayed by N252S in ALPS than by A91V in DALD, and to the possibility that the genetic hit of Fas function is more severe in ALPS than in DALD.

Fas and perforin alterations may cooperate in affecting both the antiviral response and the switching off of the immune response. Both molecules are used by cytotoxic cells to kill virus-infected cells. Moreover, Fas is highly expressed by effector lymphocytes that are switched off by several FasL⁺ cell types, but a regulatory activity also has been ascribed to perforin-mediated killing of effector lymphocytes and antigen-presenting cells.²³⁻⁴³ In this connection, it is noteworthy that OPN inhibits lymphocyte AICD, another mechanism involved in switching off the immune response. Lymphocyte accumulation and autoimmunity displayed by ALPS and DALD patients may be favored by both defective immune response switching off and decreased virus clearance that would prolong the immune response. This possibility opens the way to the view that ALPS/DALD may overlap both HLH and other inherited diseases characterized by lymphoproliferation and defective control of viral infections, such as the X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP) due to mutations of the SAP gene altering function of the 2B4 NK coreceptor.⁴⁴ Intriguingly, both ALPS and XLP are associated with high susceptibility to lymphoid neoplasia, which also seems favored by inherited PRF1 variations.⁴⁵

Acknowledgments

This work was partially supported by Telethon grant E1170 (Rome), Fondazione Italiana Sclerosi Multipla (FISM) grant 2003/R/20 (Genoa), Programma di Rilevante Interesse Nazionale (PRIN) Project (Ministero Istruzione Università Ricerca [MIUR], Rome), Fondazione Cariplo (Milan), Compagnia di San Paolo (Turin), Regione Piemonte (Turin), and Associazione Italiana Ricerca sul Cancro (AIRC) (Milan).

References

- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997; 88:355-365.
- Krammer FH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. 2000;407:789-795.
- Dianzani U, Chiochetti A, Ramenghi U. Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity. *Life Sciences*. 2003;72:2803-2824.
- Rohrer GH, Rosenberg FJ, Straus SE, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell*. 1995;81:935-946.
- Rieux-Laucat F, Le Delat F, Hivroz C, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*. 1995;268:1347-1349.
- Straus SE, Sneller M, Leonardo MJ, Puck JM, Strober W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Int Med*. 1999;130:591-601.
- Sneller MC, Dale JK, Straus SE. Autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Rheumatol*. 2002;15:417-421.
- Rieux-Laucat F, Fischer A, Le Delat F. Cell-death signaling and human disease. *Curr Opin Immunol*. 2003;15:325-331.
- Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, et al. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood*. 2001;98:194-200.
- Wang J, Zhang L, Lobito A, et al. Inherited human caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*. 1999; 95:47-58.
- Rieux-Laucat F, Le Delat F, Fischer A. Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death Diff*. 2003;10:124-133.
- Dianzani U, Bragardo M, DiFranco D, et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood*. 1997;89:2871-2879.
- Ramenghi U, Bonissoni S, Miglianetti G, et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. *Blood*. 2000;95:3176-3182.
- Jackson CE, Fischer RE, Hsu Ap, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance. *Am J Hum Gen*. 1999;64:1002-1014.
- Chiochetti A, Indelicato M, Bensi T, et al. High levels of osteopontin associated to polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood*. 2004;103:1378-1382.
- Chiochetti A, Cori C, Indelicato M, et al. Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *J Neuroimmunol*. 2005;162:172-178.
- Stapp SE, Coutouros-Lagourese R, Le Delat F, et al. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science*. 1999;286: 957-959.
- Clementi R, zur Stadt U, Savolki G, et al. Six novel mutations in the PFF1 gene in children with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet*. 2001;38:643-646.
- Ueda I, Morimoto A, Inaba T, et al. Characteristic perforin gene mutations of hemophagocytic lymphohistiocytosis patients in Japan. *Br J Haematol*. 2002;121:508-510.
- Feldmann J, Le Delat F, Cuachae-Chardin M, et al. Functional consequences of perforin gene mutations in 22 patients with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol*. 2002; 117:965-972.
- Fadelat B, Cmerius S, Hentzer JI. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: too little cell death can seriously damage your health. *Leuk Lymphoma*. 2001;42:13-30.
- Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Rev Immunol*. 2002;2:735-747.
- Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, et al. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell*. 2003; 115:461-473.

24. Clementi R, Cagna L, Dianzani U, et al. Inherited perforin and Fas mutations in a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome and lymphoma. *N Engl J Med*. 2004;351:1419-1424.
25. Campagnoli MF, Garbarini L, Guarillo P, et al. The broad spectrum of autoimmune lymphoproliferative disease: molecular bases, clinical features and long-term follow-up in 31 patients. *Haematologica*. 2006;91:538-541.
26. Zhu S, Hsu AP, Vascek MM, et al. Genetic alterations in caspase-10 may be causative or protective in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Hum Genet*. 2005;119:284-294.
27. Molleran Lee S, Wilanueva J, Sumegi J, et al. Characterisation of diverse PRF1 mutations leading to decreased natural killer cell activity in North American families with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet*. 2004;41:137-144.
28. Voskoboinik I, Thia MC, Trapani JA. A functional analysis of the putative polymorphisms A91V and N252S and 22 missense perforin mutations associated with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 2005;105:4700-4706.
29. Risma KA, Frayer RW, Filipovich AH, Sumegi J. Aberrant maturation of mutant perforin underlies the clinical diversity of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Clin Invest*. 2006;116:182-192.
30. Trambas C, Gallo F, Pende D, et al. A single amino acid change, A91V, leads to conformational changes that can impair processing to the active form of perforin. *Blood*. 2005;106:932-937.
31. Busiello R, Fimiani G, Milano MG, et al. A91V perforin variation in healthy subjects and FHLH patients. *Int J Immunogenet*. 2006;33:123-125.
32. Rioux-Laucat F, Le Deist F, De Saint Basile G. Autoimmune lymphoproliferative syndrome and perforin. *N Engl J Med*. 2005;352:906-907.
33. Su MW, Pyarajan S, Chang JH, et al. Fractitude of CD8+ cytotoxic T lymphocytes is dependent on cellular activation and perforin-mediated killing. *Eur J Immunol*. 2004;34:2459-2470.
34. Badovinac VP, Hamilton SE, Harty JT. Viral infection results in massive CD8+ T cell expansion and mortality in vaccinated perforin-deficient mice. *Immunity*. 2003;18:463-474.
35. Badovinac VP, Twinnserim AR, Harty JT. Regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis by perforin and interleukin-gamma. *Science*. 2000;290:1354-1358.
36. Marks L, Levy RB. The cytotoxic potential of regulatory T cells: what has been learned from gene knockout model systems? *Transplantation*. 2004;77:S19-S22.
37. de Saint Basile G, Rascher A. Defective cytotoxic granule-mediated cell death pathway impairs T lymphocyte homeostasis. *Curr Opin Rheumatol*. 2006;15:436-445.
38. Voskoboinik I, Thia MC, De Bono A, et al. The functional basis for hemophagocytic lymphohistiocytosis in a patient with co-inherited missense mutations in the perforin (PRF1) gene. *J Exp Med*. 2004;200:811-816.
39. Zhou S, Ou R, Huang L, Mostoslavski D. Critical role for perforin-, Fas/FasL-, and TNFR1-mediated cytotoxic pathways in down-regulation of antigen-specific T cells during persistent viral infection. *J Virol*. 2002;76:829-840.
40. Balke JN, Kuhl NR, Van Kaer L, Gill RG. NK cells promote islet allograft tolerance via a perforin-dependent mechanism. *Nat Med*. 2005;11:1059-1065.
41. Bose A, Inoue Y, Kokko KE, Laktis FG. Cutting edge: perforin down-regulates CD4 and CD8 T cell-mediated immune responses to a transplanted organ. *J Immunol*. 2003;170:1611-1614.
42. Fortazzo G, Munz C. NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *J Immunol*. 2004;172:1333-1339.
43. Della Chiesa M, Vitale M, Carlomagno S, Fortazzo G, Moretta L, Moretta A. The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD69/ NK32A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol*. 2003;33:1657-1666.
44. Nichols KE, Ma CS, Cannons JL, Schwartzberg PL, Tangye SG. Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev*. 2005;203:180-190.
45. Clementi R, Locatelli F, Dupre L, et al. A proportion of patients with lymphoma may harbor mutations of the perforin gene. *Blood*. 2005;105:4424-4428.

CONCLUSIONI

Il sequenziamento di *PRFI* in 14 pazienti con ALPS e 28 con DALD ci ha permesso di identificare due variazioni, N252S e A91V, entrambe in precedenza associate a FHL. La variazione N252S era più frequente nei pazienti con ALPS rispetto ai controlli (aumentando il rischio di sviluppare la malattia di circa 63 volte), mentre A91V era più frequente nei pazienti con DALD (aumentando il rischio di sviluppare la malattia di circa 3 volte).

N252S cade in una regione di perforina detta MAC (*Membrane-Attack Complex*), che sembra essere critica per la formazione di pori nella membrana della cellula bersaglio, ma la sua rilevanza funzionale è dibattuta in quanto è stata associata ad una normale attività citotossica delle cellule NK [84, 88, 131, 132], cosa da noi confermata nei due pazienti con ALPS portatori di tale variazione. Tuttavia, osservazioni precedenti dimostravano che uno dei due pazienti aveva presentato un pregresso marcato deficit dell'attività NK durante la prima infanzia, poi normalizzatosi al momento della nostra osservazione. E' pertanto possibile che N252S, o qualche altra variazione genica non nota ad essa associata, causi una riduzione della funzione NK nella prima infanzia, ma che il difetto sia successivamente superato grazie all'intervento di un qualche meccanismo compensatorio.

Riguardo alla variazione A91V, dati in letteratura riportano un suo effetto funzionale legato all'alterazione della conformazione della proteina, che ne riduce la stabilità e ne aumenta la degradazione [73, 88, 131-133]. In accordo con questa osservazione i nostri pazienti con DALD portatori della variazione presentavano una ridotta attività NK.

Questi dati suggeriscono che variazioni nel gene di perforina possono favorire lo sviluppo dell'ALPS/DALD quando si associano a una difettiva funzionalità di Fas (tutti i pazienti avevano infatti questo difetto funzionale). Lo studio di queste variazioni nelle famiglie dei pazienti ha dimostrato che l'associazione tra A91V e difettiva funzionalità di Fas non è però

sufficiente per favorire lo sviluppo della DALD, dal momento che alcuni familiari sani erano portatori di entrambe le alterazioni. Questa osservazione è anche valida per la variazione N252S in quanto Rieux-Laucat et al. hanno descritto un paziente con ALPS e il padre sano entrambi portatori sia di una mutazione in Fas sia di N252S in *PRF1* [134].

La tipizzazione del gene di *OPN* nei nostri pazienti ha poi dimostrato che il rischio di sviluppare DALD viene incrementato di 17 volte dalla co-presenza delle varianti geniche *OPN^{high}* e di A91V, ma nuovamente la combinazione di queste varianti geniche con il difetto di Fas non è sufficiente per indurre lo sviluppo della malattia, poiché tale combinazione era anche presente in alcuni familiari sani dei pazienti.

In conclusione questo lavoro suggerisce che variazioni a carico di *PRF1* possono agire da fattore di predisposizione per lo sviluppo di ALPS/DALD. Questa azione potrebbe essere legata al ruolo di perforina nello spegnimento della risposta immunitaria mediato dall'attività citotossica delle cellule NK, CTL, T $\gamma\delta$ e NKT indirizzata contro cellule immuni attivate. In presenza di difetti funzionali di Fas, un difetto, anche modesto, dell'attività di perforina verrebbe a inficiare un importante meccanismo di compenso del difetto di Fas. E' degno di nota che anche le varianti *OPN^{high}* del gene di osteopontina potrebbero favorire lo sviluppo di ALPS/DALD con un meccanismo analogo, in quanto esse determinano la produzione di elevati livelli di osteopontina che è in grado di inibire la *activation-induced cell death* (AICD), che rappresenta un ulteriore meccanismo di spegnimento della risposta immunitaria che può compensare il difetto di Fas.

ARTICOLO 2

RIASSUNTO

In passato il nostro laboratorio ha dimostrato che difetti ereditari della funzionalità di Fas non sono solo la causa dell'ALPS/DALD, ma sono anche coinvolti nello sviluppo di malattie autoimmuni comuni, tra cui il T1DM [18, 21, 23-25, 127]. Nel T1DM circa il 20% dei pazienti manifesta una ridotta funzionalità di Fas, ma tale percentuale cresce al 70% nei pazienti che presentano T1DM associato a una seconda malattia autoimmune [25, 128, 129]. L'osservazione che anche i genitori di questi pazienti presentano una ridotta funzionalità di Fas suggerisce che il difetto abbia basi ereditarie. Poiché questi pazienti non presentano mutazioni a carico dei geni di Fas, FasL e caspasi-10, è possibile che il loro difetto genetico sia simile a quello dei pazienti con ALPS-III.

Questa analogia con ALPS ci ha quindi indotto a valutare se anche variazioni di *PRF1* possano predisporre al T1DM oltre che all'ALPS. Abbiamo tipizzato le variazioni N252S e A91V di *PRF1* in una prima popolazione di 352 pazienti T1DM e 816 controlli e in una successiva seconda popolazione di 365 pazienti e 964 controlli. La frequenza di N252S è risultata significativamente più elevata nei pazienti rispetto ai controlli (popolazione 1: 1.3 vs 0.1%; OR=10.55 95% CI=2.13-70.82; popolazione 2: 1.8 vs 0.7%; OR=2.67, 95% CI=1.16-6.15), mentre le frequenze di A91V erano simili nei pazienti e controlli. Per valutare il possibile coinvolgimento di altre variazioni, abbiamo poi sequenziato l'intera porzione codificante di *PRF1* in 200 pazienti e 300 controlli. Questa analisi ha identificato una nuova sostituzione aminoacidica, P477A, presente in un singolo paziente e assente nei controlli. Le due variazioni presenti nei pazienti sembrano causare una riduzione dell'attività NK, in quanto questa è risultata difettiva in tre bambini eterozigoti per la N252S analizzati nella

prima infanzia, in un soggetto adulto omozigote per N252S e nel paziente portatore della nuova mutazione P477A.

BRIEF REPORT

Variations of the Perforin Gene in Patients With Type 1 Diabetes

Elisabetta Orilieri,¹ Giuseppe Cappellano,¹ Rita Clementi,¹ Angela Cometa,² Massimo Ferretti,¹ Elisa Cerutti,¹ Francesco Cadario,¹ Miryam Martinetti,³ Daniela Larizza,⁴ Valeria Calcaterra,⁴ Giuseppe D'Annunzio,⁵ Renata Lorini,⁶ Franco Cerutti,⁶ Graziella Bruno,⁷ Annalisa Chiochetti,¹ and Umberto Dianzani¹

OBJECTIVE—Perforin plays a key role in cell-mediated cytotoxicity. Mutations of its gene, *PRF1*, cause familial hemophagocytic lymphohistiocytosis but have also been associated with lymphomas and the autoimmune/lymphoproliferative syndrome. The aim of this work was to investigate the role of *PRF1* variations in type 1 diabetes.

RESEARCH DESIGN AND METHODS—We typed for the N252S and A91V variations in an initial population of 352 type 1 diabetic patients and 816 control subjects and a second population of 565 patients and 964 control subjects. Moreover, we sequenced the coding sequence and intron-exons boundaries in 200 patients and 300 control subjects.

RESULTS—In both cohorts, allelic frequency of N252S was significantly higher in patients than in control subjects (combined cohorts: 1.5 vs. 0.4%; odds ratio 6.68 [95% CI 1.83–7.48]). Sequencing of the entire coding region detected one novel mutation in one patient, causing a P477A amino acid change not detected in 199 patients and 300 control subjects. Typing for HLA-DQA1 and DQB1 alleles showed that type 1 diabetes-predisposing DQ α /DQ β heterodimers were less frequent in patients carrying N252S or P477A than in those carrying wild-type *PRF1*. We previously found that natural killer (NK) activity is not decreased in most N252S heterozygotes, but we detected one whose NK activity was normal at the age of 12 but strikingly low in early childhood. Here, we discovered that NK function was low in three heterozygotes in early childhood, one homozygous adult, and in the subject carrying P477A.

CONCLUSIONS—These data suggest that N252S and possibly other *PRF1* variations are susceptibility factors for type 1 diabetes development. *Diabetes* 57:1078–1083, 2008

From the ¹Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases and Department of Medical Sciences, A. Avogadro University of Eastern Piedmont, Novara, Italy; ²Pediatric Hematology-Oncology, University of Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy; ³Immunohaematology and Transfusion Center, University of Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy; the ⁴Department of Pediatric Sciences University of Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy; the ⁵Department of Pediatric Sciences, Gaslini Institute-IRCCS, University of Genoa, Genoa, Italy; the ⁶Department of Pediatrics, University of Turin, Turin, Italy; and the ⁷Department of Internal Medicine, University of Turin, Turin, Italy.

Address correspondence and reprint requests to Umberto Dianzani, IRCCS-Department of Medical Sciences, Via Solaroli, 17, I28100, Novara, Italy. E-mail: umberto.dianzani@iis.unipmn.it.

Received for publication 10 July 2007 and accepted in revised form 9 January 2008.

Published ahead of print at <http://diabetes.diabetesjournals.org> on 15 January 2008. DOI: 10.2337/db070047.

E.C. and G.C. contributed equally to this work.

ALPS, autoimmune lymphoproliferative syndrome; HLH, hemophagocytic lymphohistiocytosis; NK, natural killer; PBMNC, peripheral blood mononuclear cells.

© 2008 by the American Diabetes Association.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

In type 1 diabetes, autoimmune damage is mainly due to β -cell destruction by autoreactive cytotoxic T-cells by an inflammatory response organized by autoreactive TH1 cells (1,2). Ethnic variations in its incidence point to involvement of genetic and environmental factors (3,4). Susceptibility genes may include genes coding for molecules involved in immune response control and immune effector functions. Further genes may be those involved in switching off the immune response and leading to homeostatic control of the size of the peripheral lymphocyte pool and reducing the risk of autoimmunity due to cross-reactions between nonself and self antigens (3–5).

Involvement of genes participating in this switching off has been initially suggested for CTLA-4, a receptor expressed by activated T-cells that delivers negative signals upon ligation by B7.1 and B7.2. The role of these negative signals is well documented by CTLA-4-deficient mice developing severe lymphoproliferation and lymphoid infiltration of multiple organs (6). A link with type 1 diabetes has been suggested by its association with CTLA-4 gene polymorphisms associated with decreased receptor function (7–9).

A second link with defective switching off of the immune response came from our observation that a substantial proportion of type 1 diabetic patients display defective function of Fas, a death receptor triggering apoptosis of activated lymphocytes (10). The role of Fas in the immune response is shown by the finding that inherited defects of Fas function cause the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS), a rare autoimmune disease characterized by heterogeneous autoimmune manifestations, and lymphocyte accumulation in the spleen and lymph nodes (11–14).

A third mechanism involved in downmodulation of the immune response is perforin-mediated cytotoxicity (15). Cytolytic granules of CD8⁺ cytotoxic T-lymphocytes and natural killer (NK) cells contain perforin and granzymes and are released on the target cell upon its recognition by cytotoxic cells.

Perforin polymerizes on the target cell membrane where it forms pores that allow the entry of granzymes, which trigger apoptosis of the target cell by cleaving caspases (15). This cytotoxicity is crucial to kill virus-infected cells and clear viral infections but may also be involved in downmodulation of the immune response by fratricide of effector lymphocytes and antigen-presenting cells (16–18). Biallelic loss-of-function mutations of the perforin gene (*PRF1*) have been associated with ~30% of cases of

familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH), a rare life-threatening immune deficiency that occurs in infants and young adults (19–23). Furthermore, 25% of patients display mutations of the *MUNC 13-4* gene involved in perforin storage in the lytic granules and exocytosis (24). Intriguingly, some of these variations, themselves insufficient to cause HLH, seem to act as predisposing factors for the development of ALPS (25). This possibility was first suggested by the observation of an ALPS patient with a *Fas* gene mutation inherited from the father and with a *PRF1* mutation inherited from the mother. Since both parents and the patient's brother, who carried the *Fas* mutation only, were healthy, it appeared that both mutations contributed to the development of ALPS (25). This was confirmed in a larger group of ALPS patients, where two HLH-associated amino acid substitutions of *PRF1* were detected, i.e., N252S and A91V (26). The frequency of N252S was increased in typical forms of ALPS and increased the risk of its development by about 62-fold, whereas that of A91V was increased in an incomplete variant of ALPS and increased this risk by about threefold (26).

The aim of this work was to assess involvement of *PRF1* in type 1 diabetes by evaluating the frequency of N252S and A91V in two cohorts of patients and control subjects. Results showed that frequency of N252S, but not A91V, was increased in both cohorts of type 1 diabetic patients. Perforin variations may thus be involved in type 1 diabetes development in some patients.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

We analyzed two independent cohorts of type 1 diabetic patients and randomly selected, ethnically matched, healthy control subjects. Patients and control subjects were enrolled from the Diabetes Centers of the Maggiore Hospital of Novara (Novara, Italy), the S. Giovanni Battista Hospital of Turin and the Regina Margherita Children Hospital of Turin (Turin, Italy), the Gianina Gaslini Children's Hospital, University of Genoa (Genoa, Italy), and IRCCS Policlinico S. Matteo (Pavia, Italy). Patients were consecutive Italian patients followed by these Diabetes centers (Novara, $n = 68$; Turin, $n = 380$; Genoa, $n = 155$; and Pavia, $n = 75$); control subjects were consecutive Italian donors obtained from the transfusion services of the respective hospitals.

The first cohort consisted of 352 patients and 816 control subjects and the second of 365 patients and 964 control subjects. Patients and control subjects were unrelated, Caucasian, and Italian. Overlaps between different sites were ruled out.

All subjects gave informed consent according to the Declaration of Helsinki (International Committee of Medical Journal Editors, 1965). The research was approved by the ethical committee of the Maggiore Hospital of Novara.

Amplification of *PRF1* and mutation detection. Genomic DNA was isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using standard methods. In the first cohort, exons 2 and 3 of the *PRF1* coding region were amplified in standard PCR conditions. The primers used for amplification have previously been described (10). PCR products were purified with the EXO/SAP kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Sequencing was performed with the ABI PRISM BigDye™ Terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) on an automatic sequencer (Applied Biosystems 3100 Genetic Analyser) according to the manufacturer's instructions with the amplification primers plus two internal primers (forward 5'-CAGGTCAACATAGGCATCCACG-3'; reverse 5'-GAACAGCAGGTCGTTAATGGAG-3') for exon 2. In the second cohort, genotyping of +272 C/T and +755 A/G single nucleotide polymorphisms was performed with the TaqMan 5' allelic discrimination assay (Applied Biosystems).

Allelic specific primers and fluorogenic probes were used for discrimination (for +272 C/T see ref. 27; for +755 A/G Cod4951376, Applied Biosystems). Genotyping of each sample was automatically attributed by the SDS, version 1.3, software for allelic discrimination. All mutations were then confirmed by sequencing.

Cytotoxicity assays. NK activity of PBMC was assessed by a standard 4-h ^{51}Cr release assay with K562 cells as the target. Results are expressed as

specific lysis percentage, calculated as follows: $(\text{sample } ^{51}\text{Cr release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximal release} - \text{spontaneous release}) \times 100$.

Flow cytometry. Analysis of lymphocyte subset in PBMCs was performed by direct immunofluorescence and flow cytometry. Perforin expression was evaluated in fixed and permeabilized cells (Cytocis-Cytoperm, BD Pharmingen, San Diego, CA) using a phycoerythrin-conjugated anti-perforin antibody (BD Pharmingen) and flow cytometry.

HLA-DQA1 AND DQB1 genomic typing. HLA-DQA1 and DQB1 genes were typed at a high resolution level using the reverse PCR-SSO technique, as previously described (28), in 23 patients carrying N252S or P477A, 81 random patients carrying wild-type *PRF1*, and 677 healthy children recruited from the cord blood bank of the Pavia center. The control subjects were ethnically matched with the patients and checked for absence of diabetes in their families; their ages ranged from 6 months to 4 years (mean age 2.6 years).

Statistical analysis. Statistical analysis was performed with GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA). Allelic frequencies were compared with the χ^2 test or Fisher's exact test, as indicated. The Mann-Whitney test was used for NK activity. All *P* values are two tailed, and the significance cutoff was $P < 0.05$.

RESULTS

Search for the N252S and A91V variations of perforin. In *PRF1*, the C/T substitution in position 272 (rs35947132) of the cDNA (numerations are referred to the GenBank cDNA clone M28393, ATG = +1) and an A/G substitution in position 755 (rs28933375) cause an A91V and a N252S amino acid variation at the protein level, respectively, and have been associated with both HLH and ALPS. By sequencing the genomic DNA, we initially assessed the frequency of these substitutions in 352 type 1 diabetic patients and 816 control subjects. The N252S variation was found in nine type 1 diabetic patients and two control subjects (all heterozygotes). Its allelic frequency was significantly higher in type 1 diabetic (1.3%) than in control (0.1%) subjects ($P = 0.0006$) and conferred an odds ratio (OR) of 10.55 (95% CI 2.13–70.82) for type 1 diabetes development. The A91V variation was carried by 19 type 1 diabetic patients (18 heterozygotes and one homozygous) and 72 control subjects (69 heterozygotes and three homozygotes), and its allelic frequency was not significantly different in the two groups (type 1 diabetic vs. control subjects: 2.8 vs. 4.0%) (Table 1). The frequency of both variations in the control subjects was similar to that reported in other studies, and their genotypic distributions did not deviate significantly from Hardy-Weinberg equilibrium in any group.

These data indicate that N252S, but not A91V, may be a predisposing factor for type 1 diabetes development. To confirm this observation, we evaluated both variations in a second cohort of type 1 diabetic patients ($n = 365$) and control subjects ($n = 964$) using the TaqMan 5' allelic discrimination assay. N252S was found in 13 type 1 diabetic patients and 13 control subjects (all heterozygotes). Its allelic frequency was higher in type 1 diabetic patients (1.8%) than in the control subjects (0.7%) ($P = 0.0179$) and conferred an OR of 2.67 (95% CI 1.16–6.15) for type 1 diabetes development. A91V was carried by 36 type 1 diabetic patients (35 heterozygotes and one homozygote) and 118 control subjects (115 heterozygotes and three homozygotes), and its allelic frequency was not significantly different in the two groups (type 1 diabetic vs. control subjects 5 vs. 6.3%, respectively) (Table 1). The genotypic distributions of these variations did not deviate significantly from Hardy-Weinberg equilibrium in either group. No difference was found between the N252S carriers and the other patients with regard to sex distribution, age at diagnosis of type 1 diabetes, or presence of a second concomitant autoimmune disease (Table 2).

PERFORIN AND DIABETES

TABLE 1
Frequency distribution of the N252S and A91V variations of *PRF1* in two independent cohorts of type 1 diabetic patients and healthy control subjects

	Population 1		Population 2		Total population	
	Patients*	Control subjects	Patients*	Control subjects	Patients*	Control subjects
A91V						
Alleles†						
A	684 (97.2)	1,557 (95.4)	693 (96)	1,807 (93.7)	1,377 (96)	3,364 (94.5)
V	20 (2.8)	75 (4.6)	37 (5)	121 (6.3)	57 (4)	196 (5.5)
Statistics‡	N.S.		N.S.		N.S.	
Genotypes§						
AA	333 (94.6)	744 (91.2)	329 (90.1)	846 (87.7)	662 (92.3)	1,590 (89.3)
AV	18 (5.1)	69 (8.5)	35 (9.6)	115 (11.9)	53 (7.4)	184 (10.3)
VV	1 (0.3)	3 (0.3)	1 (0.3)	3 (0.3)	2 (0.3)	6 (0.4)
N252S						
Alleles†						
N	695 (98.7)	1,630 (99.9)	717 (98.2)	1,915 (99.3)	1,412 (98.5)	3,545 (99.6)
S	9 (1.3)	2 (0.1)	13 (1.8)	13 (0.7)	22 (1.5)	15 (0.4)
Statistics‡	10.55 (2.13–70.82)		2.67 (1.16–6.15)		3.68 (1.83–7.48)	
Genotypes§						
NN	343 (97.4)	814 (99.8)	352 (96.4)	951 (98.7)	665 (96.9)	1,765 (99.2)
NS	9 (2.6)	2 (0.2)	13 (3.6)	13 (1.3)	22 (3.1)	15 (0.8)
SS	0	0	0	0	0	0

Data are n (%) or OR (95% CI). *Type 1 diabetic patients. Data shown are number of †chromosomes or §subjects. Genotypic distribution did not deviate significantly from Hardy-Weinberg equilibrium in any group (data not shown). ‡ χ^2 test calculated on allelic frequencies; P values are two tailed; population 1, P = 0.0006; population 2, P = 0.0179; population 3, P = 0.00007.

Analysis of the *PRF1* gene. To assess whether type 1 diabetic patients carry other variations of *PRF1*, the entire coding sequence plus intron-exon boundaries were sequenced in 200 type 1 diabetic patients and 300 control subjects. Besides A91V and N252S, four other known nucleotide variations were detected but were not further evaluated because they did not change the amino acid or influence the splicing sites. Two, C822T (rs885821) and T900C (rs885822), had been previously reported as common polymorphisms not associated with HLH. Their frequency was similar in the patients and the control subjects (C822T, 15 vs. 12%; T900C, 43 vs. 40%). The other two (G435A and A462G) are known to be in perfect linkage disequilibrium with N252S and were in fact only detected in all subjects carrying this variation (25). Moreover, we detected a novel variation in one type 1 diabetic patient, a C/G substitution in position 1,429 (C1429G) causing a P477A amino acid change at the protein level. This variation was not found in any other subject.

Analysis of NK function and HLA-DQ typing. We had previously found, like other workers, that NK activity is not decreased in subjects carrying N252S. However, we also described an ALPS patient heterozygous for N252S whose NK activity was normal at age 12 years but had been almost undetectable at age 3 years and extremely low at the age 5 years (26). We suggested that, in this patient, N252S was associated with factors decreasing NK function

in early childhood, followed by normalization on the part of unknown compensatory mechanisms. Because in this study we detected three N252S heterozygous subjects the early childhood, we assessed whether their N252S was associated with defective NK function by evaluating NK cell count, NK activity, and perforin expression in their PBMCs (Table 3). Two (patients 1 and 2) had type 1 diabetes, whereas the third was the healthy sister of patient 1.

Moreover, we performed the same analyses in patient 1's healthy father, who was homozygous for N252S; in his wild-type mother; and in the type 1 diabetic patient heterozygous for the novel P477A mutation (patient 3). Results showed that NK activity was defective in patient 1, his sister, and father, whereas it was low but in the normal range in the mother not carrying the mutation; all these subjects displayed normal perforin expression. In patient 2, NK activity was borderline and perforin expression was decreased. In patient 3 (P477A), both NK activity and perforin expression were defective. NK cell counts were normal in all subjects. Specificity of the NK function defect was assessed by evaluating NK function in 10 children in early childhood (age <5 years) and lacking *PRF1* variations; 5 were healthy, whereas 5 had type 1 diabetes. Results showed that NK activity of these children was similar to that displayed by our random control subjects (reported in Table 3) and significantly higher (P < 0.01)

TABLE 2
Demographic and clinical parameters of type 1 diabetic patients with and without N252S

<i>PRF1</i> N252S	n*	Male/female†	Age (years)‡	Age at diabetes diagnosis (years)	Second autoimmunity		
					Thyroid	Celiac disease	Multiple sclerosis
N	695	374/321	27 (17–36)	13.5 (8–21)	7	7	1
S	22	15/7	26 (20–36)	13 (6–21)	2	0	0

Data are n or median (interquartile range). *Subjects. †Male/female ratio of control subjects was 1,068/712. ‡Median age of control subjects was 32 years (27–36).

TABLE 3
NK activity, perforin expression, and proportion of NK cells in PBMC of type 1 diabetic patients carrying the N252S and P477A perforin variations

PRF1 variation	Subject	Age (years)	NK activity (effector-to-target ratio)*			Perforin expression†		Peripheral blood NK cells (%)		
			100:1	30:1	10:1	Percent	MFI-R	CD3 ⁻ CD16 ⁺	CD3 ⁻ CD56 ⁺	
N252S‡	Patient 1	2	7§	4§	2	13	11	6	5	
N252S‡	Patient 1's sister	5	14§	7§	2	15	9	6	4	
N252S‡	Patient 1's father	30	8§	4§	2	23	7	7	9	
	Patient 1's mother	28	32	10	2	32	8	21	20	
N252S‡	Patient 2	4	25	10	3	17	3.5§	4	5	
P477A‡	Patient 3	3	6§	0§	2	9	3§	4§	5	
	Control subjects¶	—	40 (15–66)	26 (8–60)	14 (2–31)	23 (17–26)	9 (5–20)	11 (5–31)	17 (4–27)	

Data are n or median (5th–95th percentile) unless otherwise indicated. *NK activity is expressed as specific cell lysis percent, and it is the mean of triplicate assays, whose SD was always <10% of the mean. Spontaneous cell lysis was always <10% of maximal cell lysis. †Perforin expression is shown as proportion of positive cells (%) and mean fluorescence intensity ratio (MFI-R). ‡Heterozygous. §Represents <5th percentile of control subjects. ¶Homozygous. ¶n = 13 controls.

than that displayed by patients 1, 2, and 3 and by patient 1's sister (Fig. 1).

Finally, we evaluated the frequencies of DQαβ diabetogenic heterodimers in type 1 diabetic patients carrying or not carrying the N252S or P477A variations and in 677 healthy control subjects. In this analysis, susceptible heterodimers were those comprising a DQα chain with an arginine at position 52 and a DQβ chain with a nonaspartic acid at position 57; a subject can have one, two, or four susceptible heterodimers; the higher the number, the higher the risk for type 1 diabetes (29). Table 4 shows that the distribution of subjects carrying zero, one, two, or four susceptible heterodimers was significantly different in the two patient groups (overall $P = 0.028$). The proportion of carriers of four predisposing heterodimers was significantly lower in the N252S/P477A group than in the wild-type group (34.8 vs. 65.4%, $P = 0.015$), but it was higher in

both patient groups than in the control subjects (1.0%, $P < 0.0001$ vs. both patient groups).

DISCUSSION

This paper stems from our finding that variations of *PRF1* may be a predisposing factor for development of ALPS, a rare inherited autoimmune disease (26). It shows that *PRF1* variations may also predispose to development of type 1 diabetes.

Of the two *PRF1* variations associated with ALPS, i.e., N252S and A91V, only N252S was associated with type 1 diabetes, since its frequency was significantly higher in two independent groups of type 1 diabetic patients than in the respective control subjects. The OR calculated in the combined cohorts (717 patients and 1,780 control subjects) was 3.68 (95% CI 1.83–7.48; $P = 0.00007$). *PRF1* is located on chromosome 10q22, far from the known type 1 diabetes susceptibility loci located on this chromosome, i.e., IDDM10 (10p11-q11) and IDDM17 (10q25). However, other genes involved in cell death (*PPIF*) or cell-mediated cytotoxicity (*PRGI*) are located nearby *PRF1*, and we cannot rule out linkage disequilibrium between the *PRF1*

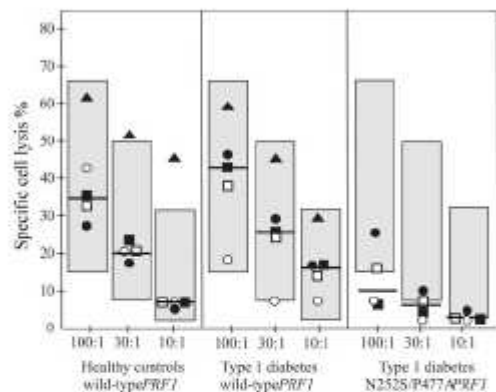


FIG. 1. NK activity in PBMC of type 1 diabetic patients carrying the N252S and P477A perforin variations and in age-matched subjects carrying wild-type *PRF1* with or without type 1 diabetes. All subjects were aged <5 years. NK activity was assessed at the 100:1, 30:1, and 10:1 effector-to-target ratios; each subject is marked with the same symbol in the different effector-to-target ratios. Gray boxes indicate the 5th–95th percentile interval of NK activity assessed in normal random control subjects (those of Table 3). Horizontal lines indicate the medians. Statistical analysis was performed with the Mann-Whitney test (type 1 diabetic patients: N252S/P477A vs. wild-type, $P = 0.0003$; N252S/P477A vs. control subjects, $P = 0.0009$).

TABLE 4
Distribution of subjects with different numbers of type 1 diabetes-predisposing HLA-DQαβ heterodimers in type 1 diabetic patients carrying or not carrying the N252S or P477A variations and in control subjects

Predisposing HLA-DQαβ heterodimers	N252S/P477A <i>PRF1</i>	Wild-type <i>PRF1</i>	Control subjects*
n	23	81	677
0	5 (21.7)	7 (8.6)	356 (52.6%)
1	1 (4.3)	6 (7.4)	185 (27.3%)
2	9 (39.1)	15 (18.5)	125 (18.5%)
4	8 (34.8)	53 (65.4)	11 (1.6%)
Statistics†			
Overall P		0.028‡	<0.0001§
4-carriers		0.015‡	<0.0001§

Susceptible heterodimers are HLA-DQα52Arg and DQβ57nonAsp. *Healthy babies recruited from the cord blood bank of the transfusion center. †Fisher's exact test calculated on overall frequencies or comparing the frequency of subjects carrying 4 predisposing heterodimers (4-carriers). ‡N252S/P477A mutated patients vs. nonmutated (wild-type) patients. §Control subjects vs. diabetic patients (the same significance was obtained with each patient group).

variations and those that may play a role in the effector phase of β -cell destruction.

Several works have shown that A91V decreases perforin function by altering its conformation, decreasing its cleavage to the active form, and increasing its degradation (30–33). By contrast, the functional significance of N252S has been debated because it occurs within the membrane-attack complex, a region critically involved in the pore-forming activity of perforin, but several works have associated it with normal NK function and perforin expression (19,31–33). However, these studies were performed on cells from N252S heterozygotes or artificial systems where mutated forms of perforin were transfected in reporter cell lines to assess their expression. We have recently described an ALPS patient heterozygous for N252S who displayed a striking deficiency of NK activity when he was aged 3–5 years followed by normalization when he was aged 12 years (26). Therefore, we suggested that N252S heterozygosity per se or other factors associated with it may decrease NK function in early childhood.

Our present findings substantiate this possibility, since it describes three new children heterozygous for N252S with low NK function in their early childhood. A follow-up will show whether compensatory mechanisms eventually normalize their NK function. A second point is that we also detected low NK function in an adult homozygous for N252S. In the presence of homozygosity, therefore, these mechanisms may not be sufficient. However, N252S homozygosity is not sufficient to induce development of type 1 diabetes, ALPS, or HLH. It is noteworthy that variations altering NK function in early childhood may be particularly significant for type 1 diabetes since it is the outcome of a transient autoimmune aggression that destroys β -cells, generally in childhood.

Intriguingly, one type 1 diabetic patient displayed a novel *PRFI* mutation causing the P477A substitution. This mutation was only found in this subject and has never been detected in HLH patients. Its location within the carboxy-terminal C2 domain of perforin suggests that it may have functional significance, since this domain plays a key role in Ca^{2+} -dependent binding of perforin to membranes, the first step of perforin-mediated lytic activity (34). In line with this possibility, our analysis of PBMC from this patient detected defective NK activity and normal perforin expression. In addition to the recurrent N252S mutation, therefore, other sporadic perforin mutations might favor type 1 diabetes development, and the global predisposing effect of perforin variation in type 1 diabetes development may be higher than that calculated for N252S.

Nevertheless, perforin variations are a rare predisposing factor: N252S was carried by 1.5% patients and P477A by 0.5%. N252S-mediated predisposition seems to require concurrence of HLA-predisposing alleles, since about 80% of patients carrying N252S also carried HLA-DQ heterodimers involved in type 1 diabetes susceptibility. However, susceptibility dependent on HLA-DQ seems to be lower in patients carrying the *PRFI* variations than in those carrying wild-type *PRFI*, which suggests that *PRFI* contributes to the onset of type 1 diabetes additionally and independently from HLA. *PRFI* variations may thus be a predisposing factor for type 1 diabetes. Perforin-mediated cytotoxicity is the main effector system in clearance of virus-infected cells but may also be involved in downregulation of the immune response due to its involvement in fratricide of effector lymphocytes and antigen-presenting

cells (15–18,35–39). Defects of both of these functions may predispose to autoimmunity by prolonging the immune response and increasing the risk of cross-reactions between viral and self antigens by molecular mimicry.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by Compagnia di San Paolo (Turin, Italy), Regione Piemonte (Turin, Italy), Telethon Grant E1170 (Rome, Italy), the PRIN Project (MIUR, Rome, Italy), and AIRC (Milan, Italy).

We are grateful to Dr. Rita Maccario (Department of Pediatric Sciences, University of Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy) for helpful discussion.

REFERENCES

1. Yoon JW, Jun HS: Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am J Ther* 12:580–591, 2005
2. Santamaria P: Effector lymphocytes in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 13:663–669, 2001
3. Hirschhorn JN: Genetic epidemiology of type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 4:87–100, 2003
4. Jahromi MM, Eisenbarth GS: Genetic determinants of type 1 diabetes across populations. *Annu NY Acad Sci* 1070:259–60, 2006
5. Wicker LS, Clark J, Fraser HI, Garner VE, Gonzalez-Munoz A, Healy B, Howlett S, Hunter K, Rainbow D, Rosa RL, Srinik LJ, Todd JA, Peterson LB: Type 1 diabetes genes and pathways shared by humans and NOD mice. *J Autoimmun* 25 (Suppl.):29–33, 2005
6. Tirol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH: Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3:541–547, 1998
7. Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, Pufalen ME, Alegre ML, DeGroot LJ: CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *The J Immunol* 165:6606–6611, 2000
8. Turpeinen H, Latno AP, Hämäläinen R, Smell O, Vajjala R, Korp M, Ilonen J: A linkage analysis of the CTLA4 gene region in Finnish patients with type 1 diabetes. *Eur J Immunogenet* 30:239–293, 2003
9. Marron MP, Raffel LJ, Garchon HJ, Jacob CO, Serrano-Rios M, Martinez Larrad MT, Teng WP, Park Y, Zhang ZX, Goldstein DR, Tao YW, Beaurain G, Bach JF, Huang HS, Luo DF, Zeldner A, Rottor JJ, Yang MC, Modilevsky T, Maclaren NK, Sho JX: Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet* 6:1275–1282, 1997
10. De Franco S, Bonissanti S, Cerutti F, Bona G, Bottarol F, Cadario F, Brusco A, Loffredo G, Rabboni I, Corrias A, Pignata C, Ramonchi U, Dianzani U: Defective function of Fas in patients with type 1 diabetes associated with other autoimmune diseases. *Diabetes* 50:483–488, 2001
11. Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W: An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Int Med* 130:591–601, 1999
12. Sneller MC, Dale JK, Straus SE: Autoimmune lymphoproliferative syndromes. *Curr Opin Rheum* 15:417–421, 2003
13. Rioux-Lucas F, Le Deist F, Fischer A: Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathway. *Cell Death Diff* 10:124–133, 2003
14. Dianzani U, Chiochetti A, Ramonchi U: Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity. *Life Sciences* 72:2909–2924, 2003
15. Taparó JA, Smyth MJ: Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2:735–747, 2002
16. Su MW, Pyarajan S, Chang JH, Yu CL, Jin YJ, Stierhof YD, Walden P, Burakoff SJ: Prerequisite of CD8+ cytotoxic T lymphocytes is dependent on cellular activation and perforin-mediated killing. *Eur J Immunol* 34:2450–2470, 2004
17. Budovnic VE, Hamilton SE, Harty JT: Viral infection results in massive CD8+ T-cell expansion and mortality in vaccinated perforin-deficient mice. *Immunity* 18:463–474, 2003
18. Zhou S, Ou R, Huang L, Moskopchids D: Critical role for perforin, Fas/FasL, and TNFR1-mediated cytotoxic pathways in down-regulation of antigen-specific T-cells during persistent viral infection. *J Virol* 76:820–840, 2002
19. Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, Bhanan S, Certain S, Mathew PA, Hantor JJ, Bennett M, Fischer A, de Saint-Basile G, Jumar V: Perforin

- gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* 286:957-960, 1990
20. Clementi R, zur Stadt U, Saroldi G, Varotto S, Conter V, De Fusco C, Notarangelo LD, Schneider M, Klersy C, Janke G, Danesino C, Arico M: Six novel mutations in the PRF1 gene in children with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet* 38:643-646, 2001
 21. Ueda I, Morimoto A, Inaba T, Yagi T, Hibi S, Sugimoto T, Sako M, Yanai F, Pulushima T, Nakayama M, Ishii E, Iwashita S: Characteristic perforin gene mutations of hemophagocytic lymphohistiocytosis patients in Japan. *Br J Haematol* 121:503-510, 2003
 22. Feldmann J, Le Deist F, Ouachse-Charlin M, Certain S, Alexander S, Quartier P, Haddad E, Wulfrast N, Casanova JL, Blanche S, Fischer A, de Saint Basile G: Functional consequences of perforin gene mutations in 22 patients with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol* 117:925-972, 2002
 23. Padoel B, Orrenius S, Hentzer JL: Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: too little cell death can seriously damage your health. *Leuk Lymphoma* 42:13-20, 2001
 24. Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, Certain S, Bacq D, Dumont C, Lambert N, Ouachse-Charlin M, Chedeville G, Tancary H, Minard-Colin V, Vilmer E, Blanche S, Le Deist F, Fischer A, de Saint Basile G: Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 115:461-473, 2003
 25. Clementi R, Dagna L, Dianzani U, Duprè L, Dianzani I, Porzoni M, Cometa A, Chiochetti A, Sabbadini MG, Rugari C, Cesari F, Maccario R, Locatelli F, Danesino C, Ferrarini M, Bresnà M: Inherited perforin and Fas mutations in a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome and lymphoma. *N Engl J Med* 351:1419-1424, 2004
 26. Clementi R, Chiochetti A, Cappellano G, Corutti E, Ferretti M, Orthon E, Dianzani I, Ferrarini F, Bresnà M, Danesino C, Bozzi V, Putti MC, Corutti F, Cometa A, Locatelli F, Maccario R, Ramenghi U, Dianzani U: Variations of the perforin gene patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function. *Blood* 103:3070-3084, 2004
 27. Mohita PA, Davies SM, Kumar A, Deriche M, Lee S, Zamzow T, Elliott J, Villanueva J, Pullan J, Zewge Y, Filipovich A: Perforin polymorphism A91V and susceptibility to B-precursor childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology group. *Leukemia* 20:1530-1541, 2006
 28. Infusco D, Stazi MA, Cotichini E, Cotalesa M, Martinucci ME, Mazzolla M, Cherubini V, Barbotti F, Martinotti M, Corutti F, Prisco F: Early Onset Diabetes Study Group of the Italian Society of Paediatric Endocrinology and Diabetology: Permanent diabetes mellitus in the first year of life. *Diabetologia* 45:798-804, 2002
 29. Lipton RB, Kocova M, LaPorte RE, Dorman JS, Orchard TJ, Riley WJ, Drash AL, Becker DJ, Trucco M: Autoimmunity and genetics contribute to the risk of insulin-dependent diabetes mellitus in families: islet cell antibodies and HLA DQ heterodimers. *Am J Epidemiol* 136:503-512, 1992
 30. Molleran Lee S, Villanueva J, Sumegi J, Zhang K, Kogawa K, Davis J, Filipovich AH: Characterization of diverse PRF1 mutations leading to decreased natural killer cell activity in North American families with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet* 41:137-144, 2004
 31. Trambas C, Gallo F, Pardo D, Marsanaro S, Moretta L, De Fusco C, Santoro A, Notarangelo L, Arico M, Griffiths GM: A single amino acid change, A91V, leads to conformational changes that can impair processing to the active form of perforin. *Blood* 106:932-937, 2005
 32. Voskoboinik I, Thia MC, Trapani JA: A functional analysis of the putative polymorphisms A91V and N252S and 22 missense perforin mutations associated with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 106:4700-4706, 2005
 33. Risma KA, Frayer RW, Filipovich AH, Sumegi J: Aberrant maturation of mutant perforin underlies the clinical diversity of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Clin Invest* 116:182-192, 2005
 34. Bolzho P, Voskoboinik I, Trapani JA, Smith MJ: Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr Opin Immunol* 10:329-347, 2007
 35. Badovinac VP, Trinnereim AR, Harty JT: Regulation of antigen-specific CD8+ T-cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. *Science* 290:1354-1358, 2002
 36. Marks L, Levy RB: The cytotoxic potential of regulatory T-cells: what has been learned from gene knockout model systems? *Transplantation* 77: S19-S22, 2004
 37. de Saint Basile G, Fischer A: Defective cytotoxic granule-mediated cell death pathway impairs T lymphocyte homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 15:436-445, 2003
 38. Boille JN, Kuhl NR, Van Kaer L, Gill RG: NK cells promote islet allograft tolerance via a perforin-dependent mechanism. *Nat Med* 11:1050-1055, 2005
 39. Bose A, Inoue Y, Koldo KE, Lakdas FG: Cutting edge: perforin down-regulates CD4 and CD8 T-cell-mediated immune responses to a transplanted organ. *J Immunol* 170:1611-1614, 2003

CONCLUSIONI

Mutazioni bi-alleliche del gene di perforina sono associate al 40% dei casi di FHL, rara immunodeficienza congenita. Inoltre, due variazioni monoalleliche di perforina, l'A91V e l'N252S, agiscono da fattori predisponenti all'ALPS/DALD (**articolo 1**). Questo lavoro mostra che variazioni in perforina possono rappresentare fattori di suscettibilità anche allo sviluppo T1DM. In particolare, la sostituzione N252S è risultata associata al T1DM in quanto la sua frequenza allelica è significativamente più elevata in due popolazioni indipendenti di pazienti rispetto ai controlli, incrementando il rischio di sviluppare la malattia di circa 4 volte. Nell'**articolo 1** abbiamo descritto un paziente con ALPS, eterozigote per la variazione N252S, che mostrava un deficit nell'attività NK all'età di 3 e 5 anni, seguita da una normalizzazione all'età di 12 anni. Per questo motivo avevamo ipotizzato che la variazione N252S in eterozigosi potesse determinare una diminuzione dell'attività NK evidente solo nella prima infanzia. I nuovi dati riportati in questo lavoro sui pazienti con T1DM sostengono questa ipotesi in quanto riscontrano una ridotta funzionalità NK in tre bambini eterozigoti per N252S analizzati durante la prima infanzia. L'osservazione che l'attività NK era anche ridotta in un soggetto adulto omozigote per N252S conferma il possibile effetto di questa variazione sull'attività NK. Variazioni che alterano l'attività NK durante l'infanzia potrebbero essere importanti in una malattia come il T1DM, nella quale l'aggressione autoimmune delle cellule β avviene generalmente proprio in questo periodo di vita.

Questo lavoro descrive inoltre una nuova sostituzione nucleotidica del gene di perforina, C1429G, in un singolo paziente. Questa variazione determina, a livello proteico, la sostituzione della prolina in posizione 477 con una alanina (P477A) e non è mai stata descritta né in soggetti sani né in pazienti con FHL. La posizione della variazione all'interno del dominio C2 C-terminale di perforina suggerisce una sua possibile rilevanza funzionale,

poichè questo dominio gioca un ruolo cruciale nel legame Ca^{2+} -dipendente di perforina alla membrana della cellula bersaglio, prima fase dell'attività membrano-litica di perforina [73]. In effetti i nostri dati funzionali confermano che il portatore di questa variazione presentava una ridotta attività NK associata ad una normale espressione della proteina. Questa osservazione suggerisce che, oltre alla mutazione N252S, anche altre variazioni di perforina potrebbero favorire lo sviluppo del T1DM e che pertanto l'effetto di predisposizione globale delle variazioni di perforina nello sviluppo del T1DM potrebbe essere superiore rispetto a quello calcolato per la sola N252S.

La predisposizione alla malattia mediata dalle variazioni di *PRF1* sembra richiedere la concomitante presenza degli alleli HLA noti per essere associati allo sviluppo del T1DM, tuttavia la dipendenza dall'HLA sembra inferiore rispetto a quella osservata nei soggetti con *PRF1 wild type*. Infatti il 78% dei pazienti portatori delle variazioni di *PRF1* è anche portatore di alleli di suscettibilità MHC, contro il 91% dei pazienti con *PRF1 wild type*. Nessuna differenza è stata individuata tra i pazienti portatori delle variazioni di *PRF1* e gli altri pazienti dal punto di vista dell'età di insorgenza della malattia o presenza di una seconda malattia autoimmune.

Nel complesso questi dati indicano che variazioni nel gene di perforina possono rappresentare fattori di predisposizione allo sviluppo del T1DM. Difetti in perforina potrebbero da un lato ridurre la capacità del sistema immunitario di eliminare le infezioni virali (favorendo così il mimetismo molecolare), dall'altro determinare un difettivo meccanismo di spegnimento della risposta immunitaria.

ARTICOLO 3

RIASSUNTO

In passato il nostro laboratorio ha identificato un'associazione tra varianti polimorfiche di *OPN*, alti livelli sierici della proteina e suscettibilità allo sviluppo di ALPS/DALD. E' stato dimostrato che quattro polimorfismi, 282T>C (rs4754) e 750C>T (rs11226616) nell'esone 6, 1083A>G (rs1126772) e 1239A>C (rs9138) nel 3'UTR, formano tre combinazioni aplotipiche: aplotipo-A (282T-750C-1083A-1239A), aplotipo-B (282C-750T-1083A-1239C) e aplotipo-C (282C-750T-1083G-1239C). Il mRNA dell'aplotipo-A risulta meno stabile rispetto ai mRNA degli aplotipi-B o -C; i soggetti portatori degli aplotipi-B o -C (genotipi OPN^{high}) presentano livelli sierici di *OPN* significativamente superiori rispetto ai soggetti omozigoti per l'aplotipo-A (genotipo OPN^{low}); infine, i soggetti portatori di questi genotipi OPN^{high} presentano un rischio 8 volte più elevato di sviluppare ALPS rispetto ai portatori del genotipo OPN^{low} [135]. Studi successivi hanno poi osservato che i genotipi OPN^{high} predispongono anche, in minor misura, allo sviluppo di SM [125] e LES [136], aumentando il rischio di malattia di circa 1.5 volte rispetto ai portatori del genotipo OPN^{low} .

Scopo di questo lavoro è stato di valutare il ruolo dei genotipi OPN^{high} nella suscettibilità al T1DM. Abbiamo tipizzato la variazione +1239 A/C del gene di *OPN*, in grado di distinguere le varianti OPN^{high} (+1239C) da quelle OPN^{low} (+1239A) in una prima popolazione di 184 pazienti T1DM e 361 controlli, e una successiva seconda popolazione di 513 pazienti e 857 controlli. In entrambe le popolazioni, la frequenza di soggetti portatori dell'allele +1239C (eterozigoti e omozigoti) è risultata significativamente più elevata nei pazienti rispetto ai controlli (popolazione 1: 39 vs 29%; OR=1.90, 95% CI=1.30-2.78; popolazione 2: 34 vs 28%; OR=1.54, 95% CI=1.23-1.94). L'analisi clinica non ha individuato nessuna differenza

tra i pazienti portatori o non portatori dell'allele +1239C in termini di sesso ed età d'insorgenza della malattia.

ARTICOLO

THE OSTEOPONTIN GENE g.*1239A>C SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IS ASSOCIATED WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS IN THE ITALIAN POPULATION

Annalisa Chiocchetti PhD, MD^{1*}, Elisabetta Orilieri MS^{1*}, Giuseppe Cappellano MS¹, Nadia Barizzone MS¹, Sandra D'Alfonso MS¹, Giuseppe D'Annunzio MD², Renata Lorini MD², Roberto Ravazzolo MD², Francesco Cadario MD¹, Miryam Martinetti MS³, Valeria Calcaterra MD⁴, Franco Cerutti MD⁵, Graziella Bruno MD⁶, Daniela Larizza MD⁴ and Umberto Dianzani PhD, MD¹

¹Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases and Department of Medical Sciences, "A. Avogadro" University of Eastern Piedmont, Novara, Italy;

²Department of Pediatric Sciences and Laboratory of Molecular Genetics Gaslini Institute-IRCCS, University of Genoa, Genoa, Italy;

³Immunohaematology and Transfusion Center Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy;

⁴Department of Pediatric Sciences University of Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy;

⁵Department of Pediatrics and ⁶Department of Internal Medicine, University of Turin, Turin, Italy.

*** These authors equally contributed to this work**

Address correspondence to:

Umberto Dianzani

IRCAD-Department of Medical Sciences

Via Solaroli, 17, I-28100, Novara, Italy.

Tel:+390321660644 – Fax +390321620421

e-mail: umberto.dianzani@med.unipmn.it

ABSTRACT

Osteopontin (OPN) is a proinflammatory cytokine involved in the TH1 response and is highly expressed in the islets and pancreatic lymph nodes of non-obese diabetic mice in the early phases preceding the onset of diabetes. In humans, 4 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the OPN coding region and 3'UTR form 3 haplotypes (A, B, C); haplotype-B or -C carriers display higher serum levels than haplotype-A homozygotes and a higher risk of developing the autoimmune/lymphoproliferative syndrome, multiple sclerosis, and systemic lupus erythematosus. Aim of this work was to evaluate whether these OPN haplotypes are also associated with type 1 diabetes.

We typed the g.*1239A>C SNP, distinguishing haplotype-A (+1239A), from haplotypes-B and -C (+1239C) in an initial population of 184 type 1 diabetes patients and 361 controls, and confirmed our data in a second population of 513 patients and 857 controls.

In both cohorts, +1239C carriers displayed a significantly higher risk of type 1 diabetes than +1239A homozygotes (combined cohorts: OR=1.63, 95%CI: 1.34-1.97). Clinical analysis did not detect any differences between type 1 diabetes patients carrying or not +1239C in terms of gender distribution, age at type 1 diabetes diagnosis.

These data suggest that haplotype-B and C, marked by +1239C, are associated with type 1 diabetes development in the Italian population. The predisposing effect may depend on their effect on OPN levels that may support insulinitis.

INTRODUCTION

Type 1 diabetes is the result of selective destruction of the insulin-producing β -cells by autoimmune aggression mainly driven by pro-inflammatory type 1 T helper cells (TH1) and cytotoxic T lymphocytes (CTL) (Yoon et al.2005; Santamaria 2001). Defective insulin secretion is preceded by an asymptomatic phase characterized by insulinitis with massive invasion of the islets by a mixed population of lymphocytes and macrophages that progressively damages the β -cells. The trigger of this autoimmune aggression is elusive, but several lines of data suggest involvement of environmental factors acting on a predisposing genetic background (Hirschhorn 2003; Jahromi 2006).

Susceptibility genes for type 1 diabetes may include those coding for molecules involved in autoantigen expression, processing and presentation, the immune response control, or immune effector functions (Becker 1999; Marre 1999; Todd 1997). To date, the most important gene involved in type 1 diabetes susceptibility, identified as IDDM1, maps in the human MHC locus and an association has been reported with the HLA-DR3 and/or -DR4 antigens carried by about 80% of type 1 diabetes patients, but only about 30% of controls in the Italian population (Buzzetti et al.2004). Comparison of disease concordance between HLA-identical siblings (15-20%) and monozygotic twins (35-45%) indicates that non-MHC loci are also involved and may account for more than 50% of the genetic susceptibility. Affected sib-pair nonparametric linkage analysis has identified several other susceptibility loci provisionally designated from IDDM 2 to 15 (Becker 1999; Marre 1999; Todd 1997), but only two (i.e. IDDM2 and IDDM12) have been clearly established in independent studies in different populations, and are supported by identification of the putative susceptibility gene (Bennett et al.1996, 1995; Vafiadis et al.1997; Davies et al,1996; Morahan et al,1996; Esposito et al.1998; Mein et al.1998; Nistico et al.1996; Marron et al.1997; Marron et al.2000; Thompson et al.1996). IDDM2 maps on chromosome 11p15 in a sequence

located upstream from the insulin gene that may influence insulin expression; IDDM12 maps on chromosome 2q34 and has been associated with variations of the CTLA-4 gene that may influence expression of this receptor involved in the switching off of activated T cells. Moreover, the protein tyrosine phosphatase-22 (PTPN22) gene on chromosome 1p13 (Bottini et al.2004; Smyth et al.2004) and the interleukin-2 receptor alpha (CD25, IL2RA) locus on chromosome 10p15 have also been associated with type 1 diabetes in recent association studies (Bottini et al.2004; Smyth et al.2004; Vella et al.2005; Lowe et al. 2007).

Osteopontin (OPN) is a secreted phospho-protein that function as either a free cytokine in body fluids or an immobilized extracellular matrix molecule in mineralized tissues (Gravallese 2003; O'Regan et al.2000; Denhardt et al.2001). It is expressed by many inflammatory cells, including macrophages, T cells and NK cells, and its expression is enhanced in the inflammatory response, tissue injury, and tissue stress. It is involved in the inflammatory response by activating macrophages, but it also influences the adaptative immune response by enhancing the TH1 cell response (O'Regan et al.2000; Ashkar et al.2000). In mice, an OPN role in autoimmunity has been suggested by detection of its high levels in the blood of MRL *lpr/lpr* mice developing an autoimmune lymphoproliferative disease, and in the spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis (MS). Moreover, transgenic mice overexpressing OPN display expansion of B1 cells and production of autoantibodies (Iizuka et al.1998). A recent study investigating gene expression profiles in the islets and pancreatic lymph nodes of nonobese diabetic (NOD) mice, an animal model of type 1 diabetes, detected a striking up-regulation of OPN in the early phases preceding the onset of diabetes. In humans, high OPN levels have been detected in several autoimmune diseases, such as the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS), MS, and systemic lupus erythematosus (SLE) (Chiocchetti et al. 2004, 2005; D'Alfonso et al. 2005).

In previous works, we detected an association between variants of the OPN gene (gene map locus 4q21-q25), high serum levels of OPN, and susceptibility to autoimmunity. We showed that four single nucleotide polymorphisms (SNPs), i.e. g.282T>C (rs4754) and g.750C>T (rs11226616) in the coding region, and g.*1083A>G (rs1126772) and g.*1239A>C (rs9138) in the 3'UTR (numeration referred to ATG=+1, accession number D14813), formed three haplotypic combinations: haplotype-A (282T-750C-1083A-1239A), haplotype-B (282C-750T-1083A-1239C), and haplotype-C (282C-750T-1083G-1239C). Haplotype-A mRNA was less stable than haplotype-B and -C mRNA, and haplotype-B or -C carriers displayed about 2-fold higher serum levels of OPN than haplotype-A homozygotes. Moreover, haplotype-B or -C carriers displayed higher risk of developing ALPS (8-fold higher), MS (1.5-fold), and SLE (1.5-fold) than haplotype-A homozygotes (Chiocchetti et al. 2004,2005; D'Alfonso et al.2005).

Aim of this work was to perform an association analysis to evaluate whether these variants of the OPN gene are also involved in susceptibility to type 1 diabetes.

Patients and Methods

Patients and randomly selected, ethnically matched, healthy controls were enrolled from the Diabetes Centers of the Maggiore Hospital of Novara (Novara, Italy), the San Giovanni Battista Hospital of Turin and the Regina Margherita Children Hospital of Turin (Turin, Italy), IRCCS Policlinico S. Matteo (Pavia, Italy), and Giannina Gaslini Children's Hospital (Genoa, Italy). Patients were consecutive Italian patients followed by the Diabetes Centers of Novara (n=97), Turin (n=358), Pavia (n=69), and Genoa (n=173); controls were consecutive Italian donors obtained from the transfusion services of the respective hospitals. Patients and controls were unrelated and Italian. Overlaps between different sites were ruled out.

We typed the *1239A>C SNP in 2 independent populations of consecutive patients and controls. The first population consisted of 184 patients and 361 controls, the second of 513 patients and 857 controls. All subjects gave their informed consent according to the Declaration of Helsinki (International Committee of Medical Journal Editors, 1995). The research was approved by the local ethical committee.

DNA analysis

Genomic DNA was isolated from PBMC using standard methods. Primers used to sequence the 3'UTR were OPN-for (5'-GCCGTGAATTCCACAGCC-3') and OPN-rev (5'-GCTCTACACCACCAAATTCTTATTACATTCAAG-3'). For amplification, 200 ng of genomic DNA were used as template and PCR products were purified with the EXO/SAP kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Sequencing was performed with the ABI PRISM BigDye™ Terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on an automatic sequencer (Applied Biosystems 3100 Genetic Analyser) according to the manufacturer's instructions with the amplification primers. In the second cohort, genotyping of g.*1239 A>C

SNP was performed with the TaqMan 5' allelic discrimination assay (Applied Biosystems). Allelic specific primers and fluorogenic probes were used for discrimination (ASSAY ID C_8826997, Cod.4351376, Applied Biosystems). Genotyping of each sample was automatically attributed by the SDS 1.3 software for allelic discrimination.

HLA-DQA1 AND DQB1 genomic typing

HLA-DQA1 and DQB1 genes were typed at high resolution level using the reverse PCR-SSO technique, as previously described (Iafusco et al. 2002), in 92 patients (39 AA subjects and 53 non-AA subjects) and 677 healthy children recruited from the cord blood bank of the Pavia center. The controls were ethnically matched with the patients and checked for absence of diabetes in their families.

Statistical analysis

Genotype distributions were analyzed with the chi square (χ^2) test. All p values are 2-tailed and the significance cut-off was $p < 0.05$.

RESULTS

We typed for the g.*1239A>C an initial population of 184 type 1 diabetes patients and 361 ethnically and geographically matched controls by sequencing genomic DNA. This SNP was chosen because it distinguishes haplotype-A (displaying +1239A) from haplotypes-B and -C (displaying +1239C). Results showed that frequency of the +1239C allele was significantly higher in type 1 diabetes patients than in controls (39% vs 29%, $p=0.0005$); analysis of the genotypic distribution showed that +1239C carriers (heterozygotes and homozygotes), displayed a significantly higher risk of type 1 diabetes than +1239A homozygotes (OR=1.90, CI 1.30-2.78, $p=0.00074$) (Table 1).

To confirm these results, g.*1239A>C was typed in a second population of 513 patients and 857 controls. Here, too, frequency of the +1239C allele was significantly higher in patients than in controls (34% vs 28%, $p=0.00035$), and +1239C carriers displayed higher risk of type 1 diabetes than +1239A homozygotes (OR=1.54, 1.23-1.94, $p=0.00015$) (Table 1).

Genotypic distribution did not deviate significantly from the Hardy-Weinberg equilibrium in any group.

Clinical analysis did not detect any differences between type 1 diabetes patients carrying or not +1239C in terms of gender distribution and age at type 1 diabetes diagnosis (Table 2).

Lastly, we evaluated the frequencies of DQ α β diabetogenic heterodimers in 92 patients carrying or not +1239C, and 677 healthy controls. In this analysis, susceptible heterodimers were those comprising a DQ α chain with an arginine at position 52 and a DQ β chain with a non-aspartic acid at position 57; a subject can have 1, 2 or 4 susceptible heterodimers, the higher the number, the higher the risk of type 1 diabetes (Lipton et al.1992). Results showed that, as expected, the overall distribution of subjects carrying 0, 1, 2, or 4 susceptible heterodimers was significantly different in the patients and the controls, but it was similar in the patients carrying or not carrying

+1239C. Moreover, the proportion of subjects carrying 4 predisposing heterodimers was significantly higher in the patients than in the controls (62% vs 1.6%, $p < 10^{-5}$), but it was similar in the patients carrying or not carrying +1239C (63.3% vs 61.5%, $p = 0.88$).

These data suggests that the predisposing role of these HLA alleles is similar in these patient groups.

DISCUSSION

This work stems from our previous observation that haplotype-B and -C of the OPN gene cause production of increased amounts of OPN and favor development of ALPS, MS and SLE, and shows that they also predispose to type 1 diabetes.

This is suggested by the finding that frequency of haplotype-B and -C carriers (i.e. +1239C carriers) was higher in two independent populations of type 1 diabetes patients than in the respective controls; in the combined cohorts of 697 type 1 diabetes and 1218 controls, these haplotypes conferred an OR=1.63 for type 1 diabetes development (CI:1.34-1.97 p=0.0000005). Moreover, HLA typing of a small group of patients suggests that these haplotypes did not influence the role played by HLA predisposing alleles, whose frequency was similarly increased in patients carrying or not +1239 C.

The effect of haplotype-B and -C on type 1 diabetes development may be related to their effect on OPN production, since they are associated with a high "baseline" production that may be due to the higher stability of their mRNA than the haplotype-A mRNA, as we previously showed in transfected cells (Chiocchetti et al.2001). An alternative possibility is that haplotype-B and -C do not have a direct effect, but are in linkage disequilibrium (LD) with other variations. Indeed, the OPN gene lies in a long LD block (126kb) and, according to HapMap (<http://www.hapmap.org/>) and literature, 18 validated SNPs (with minor allele frequency >0.05) are located in the OPN genomic region. The +1239 SNP shows a high LD ($r^2 \geq 0.7$) with the 3 intragenic SNPs included in our haplotypes, and 9 other markers located in the OPN 3' flanking region or in intronic sequences of the other gene (PKD2, Polycystic Kidney Disease 2) contained in the OPN LD block. Moreover, a recent work analysing 3 SNPs in the OPN promoter showed a significant association with the -66T>G SNP (Marciano et al.2009), which is in significant LD with +1239

($D'=0.9$, $r^2=0.14$) (D'Alfonso et al. 2005). Therefore, further studies are needed to define the primarily associated variation.

A different point is the possibility that OPN also plays a role in diabetic complications, since both microarray and immunohistochemical analyses have detected high levels in kidney lesions of both type 1 and type 2 diabetes (Junaid et al.2004; Susztak et al.2004). Theoretically, OPN could support the microinflammatory processes involved in diabetic nephropathy and this effect could be exacerbated by its genetically-induced high levels. The young age of our patients, however, precluded any comparison of diabetic nephropathy in subjects with different OPN genotypes.

Recent genome-wide association studies reported no association with type 1 diabetes for markers in the OPN region in large cohorts from Canada, US, and UK (Cooper et al.2008; Hakonarson et al.2007). Although +1239 was not included in these studies, SNPs in LD ($r^2 \geq 0.6$) with +1239 were included in both studies and they did not display association. In particular, the g.282T>C (rs4754) variation, that is in high LD ($r^2=0.94$ in HapMap CEU data, $r^2=1.0$ in our samples) with +1239 and is included in our haplotypes, showed no association in about 1000 patients from Canada (C Polychronakos, personal communication). This inconsistency might be explained by a population-specific relevance of the OPN gene in type 1 diabetes.

In conclusion, this work detects an OPN gene variation that is clearly associated with type 1 diabetes development in the Italian population. The predisposing effect may depend on OPN-mediated support of inflammation and Th1 cell differentiation, which may build up an autoimmune-prone background favoring development of the autoimmune aggression of beta cells.

Acknowledgements

We thanks Dr. Constantin Polychronakos for sharing data from his genome-wide association studies. This work was partially supported by PRIN Project (MIUR, Rome), Compagnia di San Paolo (Turin), Regione Piemonte “Ricerca Finalizzata” project and “Ricerca Applicata CIPE” project (Turin), and AIRC (Milan).

References

- Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, Cantor H (2000) Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 287: 860–864
- Becker KG (1999) Comparative genetics of type 1 diabetes and autoimmune disease: common loci, common pathways? *Diabetes* 48:1353-1358
- Bennett ST, Lucassen AM, Gough SC, Powell EE, Undlien DE, Pritchard LE, Merriman ME, Kawaguchi Y, Dronsfield MJ, Pociot F, J. Nerup⁵, N. Bouzekri, A. Cambon-Thomsen, K.S. Ronningen, A.H. Barnett, S.C. Bain and J.A. Todd (1995) Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet* 9:284-292
- Bennett ST, Wilson AJ, Cucca F, Nerup J, Pociot F, McKinney PA, Barnett AH, Bain SC, Todd JA (1996) IDDM2-VNTR-encoded susceptibility to type 1 diabetes: dominant protection and parental transmission of alleles of the insulin gene-linked minisatellite locus. *J Autoimmun* 9:415-421
- Bottini, N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, MacMurray J, Meloni GF, Lucarelli P, Pellicchia M, Eisenbarth GS, Comings D, Mustelin T: A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes (2004) *Nature Genet* 36, 337–338
- Buzzetti R, Galgani A, Petrone A, Del Buono ML, Erlich HA, Bugawan TL, Lorini R, Meschi F, Multari G, Pozzilli P, Locatelli M, Bottazzo G, Di Mario U (2004) Genetic

prediction of type 1 diabetes in a population with low frequency of HLA risk genotypes and low incidence of the disease (the DIABFIN study). *Diabetes Metab Res Rev* 20:137-143

Chiocchetti A, Comi C, Indelicato M, Castelli L, Mesturini R, Bensi T, Mazzarino MC, Giordano M, D'Alfonso S, Momigliano-Richiardi P, Liguori M, Zorzon M, Amoroso A, Trojano M, Monaco F, Leone M, Magnani C, Dianzani U (2005) Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *J Neuroimmunol* 163:172-178

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 (2004) High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 103:1376-1382

Cooper JD, Smyth DJ, Smiles AM, Plagnol V, Walker NM, Allen JE, Downes K, Barrett JC, Healy BC, Mychaleckyj JC, Warram JH, Todd JA (2008) Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nat Genet* 40:1399-1401

D'Alfonso S, Barizzzone N, Giordano M, Chiocchetti A, Magnani C, Castelli L, Indelicato M, Giacopelli F, Marchini M, Scorza R, Danieli MG, Cappelli M, Migliaresi S, Bigliardo B, Sabbadini MG, Baldissera E, Galeazzi M, Sebastiani GD, Minisola G, Ravazzolo R, Dianzani U, Momigliano-Richiardi P (2005) Two single-nucleotide polymorphisms in the 5' and 3' ends of the osteopontin gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52:539-547

Davies JL, Cucca F, Goy JV, Atta ZA, Merriman ME, Wilson A, Barnett AH, Bain SC, Todd JA (1996) Saturation multipoint linkage mapping of chromosome 6q in type 1 diabetes. *Hum Mol Genet* 5:1071-1074

Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS (2001) Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 107:1055-1061

Esposito L, Hill NJ, Pritchard LE, Cucca F, Muxworthy C, Merriman ME, Wilson A, Julier C, Delepine M, Tuomilehto J, Tuomilehto-Wolf E, Ionesco-Tirgoviste C, Nistico' L, Buzzetti R, Pozzilli P, Ferrari M, Bosi E, Pociot F, Nerup J, Bain SC, Todd JA (1998) Genetic analysis of chromosome 2 in type 1 diabetes: analysis of putative loci IDDM7, IDDM12, and IDDM13 and candidate genes NRAMP1 and IA-2 and the interleukin-1 gene cluster. *Diabetes* 47:1797-1799

Gravallese EM (2003) Osteopontin: a bridge between bone and the immune system. *J Clin Invest* 112: 147- 149

Hakonarson H, Grant SF, Bradfield JP, Marchand L, Kim CE, Glessner JT, Grabs R, Casalunovo T, Taback SP, Frackelton EC, Lawson ML, Robinson LJ, Skraban R, Lu Y, Chiavacci RM, Stanley CA, Kirsch SE, Rappaport EF, Orange JS, Monos DS, Devoto M, Qu HQ (2007) Polychronakos C. A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. *Nature* 448:591-594

Hirschhorn JN (2003) Genetic epidemiology of type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 4: 87-100,

Iafusco D, Stazi MA, Cotichini R, Cotellessa M, Martinucci ME, Mazzella M, Cherubini V, Barbetti F, Martinetti M, Cerutti F, Prisco F (2002) Early Onset Diabetes Study Group of the

Italian Society of Paediatric Endocrinology and Diabetology. Permanent diabetes mellitus in the first year of life. *Diabetologia* 45:798-804

Iizuka J, Katagiri Y, Tada N, Murakami M, Ikeda T, Sato M, Hirokawa K, Okada S, Hatano M, Tokuhisa T, Uede T (1998) Introduction of an osteopontin gene confers the increase in B1 cell population and the production of anti-DNA autoantibodies. *Lab Invest* 78: 1523-1533

Jahromi MM, Eisenbarth GS (2006) Genetic determinants of type 1 diabetes across populations. *Ann N Y Acad Sci* 1079:289-299

Junaid A, Amara FM (2004) Osteopontin: correlation with interstitial fibrosis in human diabetic kidney and PI3-kinase-mediated enhancement of expression by glucose in human proximal tubular epithelial cells. *Histopathology* 44:136-146

Lipton RB, Kocova M, LaPorte RE, Dorman JS, Orchard TJ, Riley WJ, Drash AL, Becker DJ, Trucco M (1992) Autoimmunity and genetics contribute to the risk of insulin-dependent diabetes mellitus in families: islet cell antibodies and HLA DQ heterodimers. *Am J Epidemiol* 136:503-512

Lowe CE, Cooper JD, Brusko T, Walker NM, Smyth DJ, Bailey R, Bourget K, Plagnol V, Field S, Atkinson M, Clayton DG, Wicker LS, Todd JA (2007) Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes *Nat Genet* 39:1074-1082

Marciano R, D'Annunzio G, Minuto N, Pasquali L, Santamaria A, Di Duca M, Ravazzolo R, Lorini R (2009) Association of alleles at polymorphic sites in the osteopontin encoding gene in young type 1 diabetic patients. *Clin Immunol* [Epub ahead of print].

Marre M (1999) Genetics and the prediction of complications in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 22:553-58

Marron MP, Raffel LJ, Garchon HJ, Jacob CO, Serrano-Rios M, Martinez Larrad MT, Teng WP, Park Y, Zhang ZX, Goldstein DR, Tao YW, Beaurain G, Bach JF, Huang HS, Luo DF, Zeidler A, Rotter JI, Yang MC, Modilevsky T, Maclaren NK, She JX (1997) Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet* 6: 1275-1282

Marron MP, Zeidler A, Raffel LJ, Eckenrode SE, Yang JJ, Hopkins DI, Garchon HJ, Jacob CO, Serrano-Rios M, Martinez Larrad MT, Park Y, Bach JF, Rotter JI, Yang MC, She JX (2000) Genetic and physical mapping of a type 1 diabetes susceptibility gene (IDDM12) to a 100-kb phagemid artificial chromosome clone containing D2S72-CTLA4-D2S105 on chromosome 2q33. *Diabetes* 49: 492-499

Mein CA, Esposito L, Dunn MG, Johnson GC, Timms AE, Goy JV, Smith AN, Sebag-Montefiore L, Merriman ME, Wilson AJ, Pritchard LE, Cucca F, Barnett AH, Bain SC, Todd JA (1998) A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom. *Nat Genet* 19:297-300

Morahan G, Huang D, Tait BD, Colman PG, Harrison LC (1996) Markers on distal chromosome 2q linked to insulin-dependent diabetes mellitus. *Science* 272:1811-1813

Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E, Jacobs K, Mijovic C, Bain SC, Barnett AH, Vandewalle CL, Schuit F, Gorus FK, Tosi R, Pozzilli P, Todd JA (1996) The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet* 5:1075-1080

- O'Regan A, Berman JS (2000) Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol* 81:373–390
- O'Regan AW, Nau GJ, Chupp GL, Berman JS (2000) Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. *Immunol Today* 21:475–478
- Santamaria P (2001) Effector lymphocytes in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 13:663–669
- Smyth D, Cooper JD, Collins JE, Heward JM, Franklyn JA, Howson JM, Vella A, Nutland S, Rance HE, Maier L, Barratt BJ, Guja C, Ionescu-Tîrgoviste C, Savage DA, Dunger DB, Widmer B, Strachan DP, Ring SM, Walker N, Clayton DG, Twells RC, Gough SC, Todd JA (2004) Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes* 53, 3020–3023
- Susztak K, Böttinger E, Novitsky A, Liang D, Zhu Y, Ciccone E, Wu D, Dunn S, McCue P, Sharma K (2004) Molecular profiling of diabetic mouse kidney reveals novel genes linked to glomerular disease. *Diabetes* 53:784–794
- Thompson CB, Allison JP (1997) The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity* 7: 445–450
- Todd JA (1997) Genetics of type 1 diabetes. *Pathol Biol* 45:219–227
- Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, Nadeau J, Grabs R, Goodyer CG, Wickramasinghe S, Colle E, Polychronakos C (1997) Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nat Genet* 15:289–292

Vella A, Cooper JD, Lowe CE, Walker N, Nutland S, Widmer B, Jones R, Ring SM, McArdle W, Pembrey ME, Strachan DP, Dunger DB, Twells RC, Clayton DG, Todd JA (2005) Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet* 76:773-779

Yoon JW, Jun HS (2005) Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am J Ther* 12: 580-591

Table 1 Frequency distribution of OPN g.*1239 A>C alleles and genotypes in 2 independent population of type 1 diabetes patients and healthy controls

Population	Subject group	Allele ^a			Genotype ^b			Overall p ^c
		A	C		AA	AC	CC	
Population 1	Controls N=361 ^b	514 (71%)	208 (29%)	<i>P=0.00053</i>	186 (52%)	142 (39%)	33 (9%)	<i>0.0016</i>
	Patients N=184 ^b	223 (61%)	145 (39%)		66 (36%)	91 (49%)	27 (15%)	
					OR: 1.90 (1.30-2.78) P=0.00074 ^d			
Population 2	Controls N=857 ^b	1240 (72%)	474 (28%)	<i>P=0.00035</i>	448 (52%)	344 (40%)	65 (8%)	<i>0.00055</i>
	Patients N=513 ^b	675 (66%)	351 (34%)		213 (41%)	249 (49%)	51 (10%)	
					OR: 1.54 (1.23-1.94) P=0.00015 ^d			
Total Population	Controls N=1218 ^b	1754 (72%)	682 (28%)	<i>P=0.0000012</i>	634 (52%)	486 (40%)	98 (8%)	<i>0.0000019</i>
	Patients N=697 ^b	898 (64%)	496 (36%)		279 (40%)	340 (49%)	78 (11%)	
					OR: 1.63 (1.34-1.97) P=0.0000005 ^d			

a: number of chromosomes; proportions are shown in the brackets

b: number of subjects; proportions are shown in the brackets. Genotypic distribution did not deviate significantly from the Hardy-Weinberg equilibrium in any group (data not shown)

c: overall

d: Odds ratio (OR) and 95% confidence limits (CI) calculated for carriers of the C allele (i.e. AC and CC genotypes against AA)

P values are calculated with the χ^2 test and are 2-tailed

Table 2 Demographic and clinical parameters of patients carrying or not carrying the g.*1239A>C allele

	g.*1239A>C genotype	N ^a	M/F ^b	Age ^c	Age at diagnosis of type 1 diabetes ^d
Patients	AA	279	163/116 (1.4/1)	15 (11-20)	10 (6-14)
	AC+CC	418	233/185 (1.3/1)	15 (10-20)	12 (7-16)

a: number of subjects

b: males/females, number of subjects (the ratio is shown in the brackets)

c: median age when analysed (interquartile ranges in the brackets); the median age of controls was 32 (interquartile range: 27-36)

d: median age at diagnosis of type 1 diabetes in years (interquartile ranges in the brackets)

CONCLUSIONI

In passato il nostro laboratorio ha descritto l'associazione dei genotipi OPN^{high} del gene di OPN con lo sviluppo di ALPS [135], SM [125] e LES [136]. Tali polimorfismi determinano un'aumentata produzione della proteina, citochina coinvolta sia nella risposta immune cellulo-mediata che nell'inibizione dell'apoptosi linfocitaria.

Questo lavoro dimostra che questi stessi genotipi possono essere anche coinvolti nello sviluppo di T1DM, almeno nella popolazione italiana. Infatti, la frequenza dei genotipi OPN^{high} è risultata essere significativamente più alta in due popolazioni di pazienti T1DM rispetto ai controlli, aumentando il rischio di sviluppare la malattia di circa 1,6 volte.

L'effetto dei genotipi OPN^{high} sullo sviluppo di T1DM potrebbe essere *diretto*, incrementando i livelli di OPN grazie ad una maggiore stabilità degli mRNA codificati dagli aplotipi -B e -C. Tuttavia non possiamo escludere un effetto *indiretto* legato al *linkage disequilibrium* (LD) di questi polimorfismi con altre variazioni geniche. In accordo con tale possibilità, il gene di OPN si trova in un "blocco di LD" contenente diversi altri polimorfismi. Il polimorfismo +1239C da noi studiato mostra un alto LD con 3 polimorfismi presenti nel nostro aplotipo e con altri 9 marcatori vicini alla porzione 3'UTR di OPN contenuti nello stesso blocco. Inoltre, uno studio recente che ha analizzato 3 SNPs nel promotore di OPN ha dimostrato un'associazione significativa con il polimorfismo -66 T/G [137], che si trova in LD significativo con la posizione +1239 ($D'=0.9$, $r^2=0.14$) [136].

E' rilevante ricordare che recenti lavori di *genome wide analysis* effettuati su vasti, ma eterogenei campioni di pazienti con T1DM, non hanno evidenziato nessuna associazione con marcatori nel gene di OPN . Questa discrepanza suggerisce che queste varianti del gene possano essere un fattore di predisposizione popolazione-specifico.

CONCLUSIONI GENERALI DELLA TESI

Questa tesi dimostra che polimorfismi nei geni di perforina, molecola effettrice coinvolta nel sistema di immunoregolazione e osteopontina, citochina proinfiammatoria coinvolta nella risposta Th1, agiscono da fattori predisponenti all'insorgenza di due malattie autoimmuni: l'ALPS (**articolo 1**) e il T1DM (**articoli 2, articolo 3**). La prima è una malattia rara che insorge in età pediatrica ed è caratterizzata da un difetto nell'apoptosi Fas-mediata, la seconda, più frequente, insorge anch'essa in età pediatrica ed è caratterizzata dalla distruzione delle cellule β mediata dai CTL.

L'**articolo 1** mostra come variazioni nel gene di perforina possono favorire lo sviluppo dell'ALPS/DALD quando si associano a una difettiva funzionalità di Fas; infatti, il sequenziamento di *PRFI* in 14 pazienti con ALPS e 28 con DALD, ci ha permesso di identificare due variazioni, N252S e A91V, entrambe in precedenza associate a FHL: la variazione N252S era più frequente nei pazienti con ALPS rispetto ai controlli (aumentando il rischio di sviluppare la malattia di circa 63 volte), mentre A91V era più frequente nei pazienti con DALD (aumentando il rischio di sviluppare la malattia di circa 3 volte).

La variazione N252S è risultata essere associata anche allo sviluppo del T1DM (**articolo 2**), in quanto la sua frequenza allelica era significativamente più elevata in due popolazioni indipendenti di pazienti rispetto ai controlli.

Se nell'ALPS la variazione N252S conferisce un rischio aumentato di circa 63 volte di sviluppare la malattia, tale valore si riduce a circa 4 volte nel T1DM. Questa differenza potrebbe essere dovuta all'alto *background* genetico che caratterizza i pazienti affetti da ALPS e che quindi potrebbe determinare un aumento dell'effetto della variazione N252S. Questo spiegherebbe anche l'associazione della sostituzione A91V con pazienti DALD che non si riscontra invece nel T1DM.

Il ruolo funzionale della variazione N252S è ampiamente dibattuto in letteratura, in quanto la variazione cade nel MAC di perforina, regione che sembra essere critica per la formazione di pori nella membrana della cellula bersaglio, ma è stata associata ad una normale attività citotossica delle cellule NK [84, 88, 131, 132]. Tuttavia, in un paziente ALPS portatore della variazione abbiamo individuato un deficit di attività NK durante l'infanzia, deficit successivamente superato grazie all'attivazione di qualche meccanismo compensatorio (**articolo 1**). Per questo avevamo ipotizzato che la variazione N252S in eterozigosi potesse determinare una diminuzione dell'attività NK evidente solo nella prima infanzia. I nuovi dati riportati nell'**articolo 2** sui pazienti con T1DM sostengono questa ipotesi in quanto riscontrano una ridotta funzionalità NK in tre bambini eterozigoti per N252S analizzati durante la prima infanzia. L'osservazione che l'attività NK era ridotta anche in un soggetto adulto omozigote per N252S conferma il possibile effetto di questa variazione sull'attività NK. Variazioni che alterano l'attività NK durante l'infanzia potrebbero essere importanti in una malattia come il T1DM, nella quale l'aggressione autoimmune delle cellule β avviene generalmente proprio in questo periodo di vita.

Il sequenziamento dell'intera porzione codificante di perforina in 200 pazienti T1DM e 300 controlli ha permesso l'identificazione di una nuova mutazione in un paziente, P477A, variazione mai descritta né in soggetti sani né in pazienti con FHL (**articolo 2**). L'analisi funzionale della P477A ha rilevato una ridotta attività NK nel soggetto portatore della variazione associata ad una normale espressione della proteina. Questa osservazione suggerisce che, oltre alla mutazione N252S, anche altre variazioni di perforina potrebbero favorire lo sviluppo del T1DM e che pertanto l'effetto di predisposizione globale delle variazioni di perforina nello sviluppo del T1DM potrebbe essere superiore rispetto a quello calcolato per la sola N252S.

In passato il nostro laboratorio ha descritto l'associazione dei genotipi OPN^{high} del gene di OPN con lo sviluppo di ALPS [135], SM [125] e LES [136]. Tali polimorfismi determinano un'aumentata produzione della proteina, citochina coinvolta sia nella risposta immune cellulo-mediata sia nell'inibizione dell'apoptosi linfocitaria.

La tipizzazione del gene di OPN nei nostri pazienti ha dimostrato che il rischio di sviluppare DALD viene incrementato di 17 volte dalla co-presenza delle varianti geniche OPN^{high} e della variazione A91V di perforina (**articolo 1**); inoltre, questi stessi genotipi possono essere anche coinvolti nello sviluppo di T1DM, almeno nella popolazione italiana. Infatti, la frequenza dei genotipi OPN^{high} è risultata essere significativamente più alta in due popolazioni indipendenti di pazienti T1DM rispetto ai controlli, aumentando il rischio di sviluppare la malattia di circa 1,6 volte (**articolo 3**).

Nel complesso i dati riportati nei tre lavori presentati in questa tesi indicano che variazioni nei geni di perforina e osteopontina possono rappresentare fattori predisponenti allo sviluppo di ALPS/DALD e di T1DM. Difetti in perforina potrebbero da un lato ridurre la capacità del sistema immunitario di eliminare le infezioni virali (favorendo così il mimetismo molecolare), dall'altro determinare un difettivo meccanismo di spegnimento della risposta immunitaria.

Anche le varianti OPN^{high} del gene di osteopontina, mediante la produzione di elevati livelli della proteina che inibiscono la *activation-induced cell death* (AICD), potrebbero inficiare il meccanismo di spegnimento della risposta immunitaria risultando quindi fattori di predisposizione all'autoimmunità.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Adachi M., Suematsu S., Kondo T. et al. Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in the peripheral lymphoid organs and liver. *Nature Genet.* 11: 294-300, 1995.
- [2] Benihoud K., Bonardelle D., Bobé P. et al. MRL/lpr CD4⁻ CD8⁻ and CD8⁺ T cells, respectively, mediate Fas-dependent and perforin cytotoxic pathways. *Eur J Immunol.* 27: 415-420, 1997.
- [3] Wu J., Zhou T., Zhang J. et al. Correction of accelerated autoimmune disease by bearly replacement of the mutated lpr gene with the normal Fas apoptosis gene in the T cells of transgenic MLR-lpr/lpr mice. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 91: 2344-2348, 1994.
- [4] Bettinardi A., Brugnani D., Quiros-Roldan E. et al. Missense mutations in the Fas gene resulting in autoimmune lymphoproliferative syndrome: a molecular and immunological analysis. *Blood.* 89: 902-909, 1997.
- [5] Drappa J., Vaishnav A.K., Sullivan K.E. et al. Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Engl J Med.* 335: 1643-1649, 1996.
- [6] Fisher G.H., Rosemberg F.J., Straus S.E. et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell.* 81: 935-946, 1995.
- [7] Fleisher T.A., Puck J.M., Strober W. et al. The autoimmune lymphoproliferative syndrome. A disorder of human lymphocyte apoptosis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 20: 109-20, 2001.
- [8] Rieux-Laucat F., Le Deist F., Hivroz C. et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science.* 268: 1347-1349, 1995.

- [9] Straus S.E., Sneller M., Lenardo M.J. et al. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med.* 130: 591-601, 1999.
- [10] Lopatin U., Williams R.K., Bleesing J.J.H. et al. Increases in circulating and lymphoid tissue interleukin-10 in autoimmune lymphoproliferative syndrome are associated with diseases expression. *Blood.* 97: 3161-3170, 2001.
- [11] Campagnoli M.F., Garbarini L., Quarello P. et al. The broad spectrum of autoimmune lymphoproliferative disease: molecular bases, clinical features and long-term follow-up in 31 patients. *Haematologica.* 91: 538-541, 2006.
- [12] Martin D.A., Zheng L., Siegel R.M. et al. Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia. *PNAS.* 96: 4552-4557, 1999.
- [13] Wu J., Wilson J., He J. et al. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest.* 98: 1107–1113, 1996.
- [14] Bi L., Pan G., Atkinson T.P. et al. Dominant inhibition of Fas ligand-mediated apoptosis due to heterozygous mutation associated with ALPS type Ib. *BMC Med Genet.* 8: 41, 2007.
- [15] Del Rey M., Ruiz-Contreras J., Bosque A. et al. A homozygous Fas ligand gene mutation in a patient causes a new type of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood.* 108: 1306–1312, 2006.
- [16] Oliveira J.B., Bidere N., Niemela J.E. et al. NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *PNAS.* 21: 8953-8958, 2007.
- [17] Nagata S., Golstein P. The Fas death factor. *Science.* 267: 1449-1456, 1995.
- [18] Ramenghi U., Bonisconi S., Migliaretti G. et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. *Blood.* 95: 3176-3182, 2000.

- [19] Van Der Werff Ten Bosch J., Otten J., Thielemans K. Autoimmune lymphoproliferative syndrome type III: an indefinite disorder. *Leuk Lymphoma*. 41: 55-65, 2001.
- [20] Renkl A.C, Wussler J., Ahrens T. et al. Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th-1 polarizing phenotype. *Blood*. 106: 946-955, 2005.
- [21] Dianzani U., Bragardo M., DiFranco D. et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferations. *Blood*. 89: 2871-2879, 1997.
- [22] Dianzani U., Chiocchetti A., Ramenghi U. Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity. *Life Sciences*. 72: 2803-2824, 2003.
- [23] Bona G., DeFranco S., Chiocchetti A. et al. Detective function of Fas in T cells from pediatric patients with autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol*. 133: 430-7, 2003.
- [24] Comi C., Leone M., Bonisconi S. et al. Defective T cell Fas function in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 55: 921-7, 2000.
- [25] DeFranco S., Bonisconi S., Cerutti F. et al. Defective function of Fas in patients with type 1 diabetes associated with other autoimmune diseases. *Diabetes*. 50: 483-8, 2001.
- [26] Redondo M.J., Fain P.R., Eisenbarth G.S. Genetics of type 1A diabetes. *Recent Prog Horm Res*. 56: 69-89, 2001.
- [27] Lambert A.P., Gillespie K.M., Thomson G. et al. Absolute risk of childhood-onset type 1 diabetes defined by human leukocyte antigen class II genotype: a population-based study in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab*. 89: 4037-43, 2004.
- [28] Devendra D., Liu E., Eisenbarth G.S. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ*. 328: 750-54, 2004.

- [29] Abiru N., Kawasaky E. Eguch K. Current knowledge of Japanese type 1 diabetes syndrome. *Diabetes Metab Res Rev.* 18: 357-66, 2002.
- [30] Bottazzo G.F. Clinical aspects of Immunology. *Scient Pub.* 1993.
- [31] Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr. Rev.* 15: 516, 1994.
- [32] Bosi E., Todd I., Pujol-Borrell R. et al. Mechanism of autoimmunity: relevance to the pathogenesis of type I (insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.* 3: 893, 1987.
- [33] Lammi N., Karvonen M., Tuomilehto J. Do microbes have a casual role in type 1 diabetes? *Med Scin Monit.* 11: RA63-69, 2005.
- [34] Robles D.T., Eisenbarth G.S. Type 1A diabetes by infection and immunization. *J.Autoimmun.* 16: 355-62, 2001.
- [35] Helgason T., Jonasson M.R. Evidence for a food additive as a cause of ketosis-prone diabetes. *Lancet.* 318: 716-20, 1981.
- [36] Akerblom H.K., Vaarala O., Hyöty H. et al. Environmental factors in the etiology of type I diabetes. *Am.J.Med.Genet.* 115: 18-29, 2002.
- [37] Virtanen S.M., Laara E., Hyppönen E. et al. Cow's milk consumption, HLA-DQB1 genotype, and type I diabetes: a nested case-control study of siblings of children with diabetes. Childhood diabetes in Finland study group. *Diabetes.* 49: 912-17, 2000.
- [38] Vaarala O., Knip M., Paronen J. et al. Cow's milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infants at genetic risk for type I diabetes. *Diabete.* 48: 1389-94, 1999.
- [39] Thorsdottir I., Ramel A. Dietary intake of 10-to16-years-old children and adolescents in central and northern Europe and association with the incidence of type I diabetes. *Ann.Nutr.Metab.* 47: 267-75, 2003.

- [40] Norris J.M., Barriga K., Klingensmith G. et al. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA*. 290: 1713-20, 2003.
- [41] Jahromi M.M., Eisenbarth G.S. Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. *Cell Mol Life Sci*. 64: 865-72, 2007.
- [42] Kim M.S., Polychronakos C. Immunogenetics of type 1 diabetes. *Horm Res*. 64: 180-8, 2005.
- [43] Todd J.A., Walker N.M., Cooper J.D. et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet*. 447: 661-78, 2007.
- [44] The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 447: 661-78, 2007.
- [45] Tivol E.A., Borriello F., Schweitzer A.N. et al. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 3: 541-547, 1995.
- [46] Kouki T., Sawai Y., Gardine C.A. et al. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *The J Immunol*. 165: 6606-6611, 2000.
- [47] Turpeinen H., Laine A.P., Hermann R. et al. A linkage analysis of the CTLA-4 gene region in Finnish patients with type 1 diabetes. *Eur J Immunogenet*. 30: 289-293, 2003.
- [48] Marron M.P., Raffel L.J., Garchon H.J. et al. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA-4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet*. 6: 1275-1282, 1997.
- [49] Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet*. 367: 847-58, 2006.
- [50] Wong F.S., Wen L. What can the HLA transgenic mouse tell us about autoimmune diabetes? *Diabetologia*. 47: 1476-87, 2004.

- [51] Cnop M., Welsh N., Jonas J.C. et al. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*. 54(Suppl 2): S97-107, 2005.
- [52] Eizirik D.L., Mandrup-Poulsen T. A choice of death - the signaltransduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*. 44: 2115-33, 2001.
- [53] Yoon J.W., Jun H.S. Autoimmune destruction of pancreatic beta-cells. *Am J Ther*. 12: 580-91, 2005.
- [54] Kawasaki E., Abiru N., Eguchi K. Prevention of type 1 diabetes: from the view point of beta-cell damage. *Diabetes Res Clin Pract*. 66(Suppl 1): S27-32, 2004.
- [55] Pearl-Yafe M., Kaminitz A., Yolcu E.S. et al. Pancreatic islets under attack: cellular and molecular effectors. *Curr Pharm Des*. 13: 749-60, 2007.
- [56] O'Shea J.J., Ma A., Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nature Rev Immunol*. 2: 37-45, 2002.
- [57] Korsmeyer S.J. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res*. 59: 1693-1700, 1999.
- [58] Chao DT, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*. 6: 395-419, 1998.
- [59] Oltvai Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 74: 609-619, 1993.
- [60] Wong F.S., Janeway Jr C. A Insulin-dependent diabetes mellitus and its animal models. *Curr Opin Immunol* 11 (6): 643-647, 1999.
- [61] Johnson G.C., Payne F., Nutland S. et al. A comprehensive, statistically powered analysis of GAD2 in type 1 diabetes. *Diabetes* 51: 2866-2870, 2002.

- [62] Notkins A.L., Lan M.S., Leslie R.D. IA-2 and IA-2beta: the immune response in IDDM. *Diabetes Metab Rev* 14 (1): 85-93, 1998.
- [63] Miao D., Yu L., Tiberti C. et al. ICA512(IA-2) epitope specific assays distinguish transient from diabetes associated autoantibodies. *J Autoimmun.* 18 (2): 191-196, 2002.
- [64] Kelemen K., Wegmann D.R., Hutton J.C. T-cell epitope analysis on the autoantigen phogrin (IA-2 β) in the nonobese diabetic mouse. *Diabetes.* 50 (8): 1729-1734, 2001.
- [65] Notkins A.L., Lernmark A. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *J Clin Invest.* 108 (9): 1247-1252, 2001.
- [66] Colon J.M. Evolution of the insulin molecule: insights into structure-activity and phylogenetic relationship. *Peptides.* 22 (7): 1183-1193, 2001.
- [67] <http://darimar.altervista.org/diabete/insulina.htm>
- [68] La Glasse J.M., Brantley M.S., Leech N.J. et al. Washington State Diabetes prediction study Successful prospective prediction of type 1 diabetes in schoolchildren through multiple defined autoantibodies. *Diabetes Care.* 25: 505-511, 2002.
- [69] Adorini L., Gregori S., Harrison L.C. Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. *Trends Mol Med.* 8: 31-38, 2002.
- [70] Levi-Marchal C., Dubois F., Noel M. et al. Immunogenetic determinants and prediction of IDDM in French schoolchildren. *Diabetes.* 44: 1029-1032, 1995.
- [71] Kawasaki E., Sera Y., Abiru N. et al. Distinct IA-2 autoantibody epitope recognition between childhood-onset and adult-onset type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 958: 235-240, 2002.
- [72] Yu L., Robles D.T., Abiru N. et al. Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (4): 1701-1706, 2000.

- [73] Bolitho P., Voskoboinik I., Trapani J.A. et al. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr Opin Immunol.* 19: 339-47, 2007.
- [74] Lichtenheld M.G., Podack E.R. Structure of the human perforin gene. A simple gene organization with interesting potential regulatory sequences. *J Immunol.* 143: 4267-74, 1989.
- [75] Lichtenheld M.G., Olsen K.J., Lu P. et al. Structure and function of human perforin. *Nature.* 335: 448-5, 1988.
- [76] Uellner R., Zvelebil M.J., Hopkins J. et al. Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain. *EMBO J.* 16: 7287-96, 1997.
- [77] Nalefski E.A., Falke J.J. The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci.* 5: 2375-90, 1996.
- [78] Pappa H., Murray-Rust J., Dekker L.V. et al. Crystal structure of the C2 domain from protein kinase C-delta. *Structure.* 6: 885-94, 1998.
- [79] Sutton R.B., Ernst J.A., Brunger A.T. et al. Crystal structure of the cytosolic C2A-C2B domains of synaptotagmin III. Implications for Ca(+2)-independent snare complex interaction. *J Cell Biol.* 147: 589-98, 1999.
- [80] Voskoboinik I., Thia M.C., Fletcher J. et al. Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues. 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J Biol Chem.* 280: 8426-34, 2005.
- [81] Fadeel B., Orrenius S., Henter J.I. Induction of apoptosis and caspase activation in cells obtained from familial haemophagocytic lymphohistiocytosis patients. *British Journal of Haematology.* 106: 406-415, 1999.

- [82] Ohadi M., Lalloz M.R., Sham P. et al. Localization of a gene for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis at chromosome 9q21.3–22 by homozygosity mapping. *American Journal of Human Genetics*. 64: 165–171, 1999.
- [83] Goransdotter Ericson K., Fadeel B., Nilsson-Ardnor S. et al. Spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *American Journal of Human Genetics*. 68: 590–597, 2001.
- [84] Stepp S.E., Dufourcq-Lagelouse R., Le Deist. et al. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science*. 286: 1957–1959, 1999.
- [85] Feldmann J., Callebaut I., Raposo G. et al. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell*. 15: 461–473, 2003.
- [86] Bryceson Y.T., Rudd E., Zheng C. et al. Defective cytotoxic lymphocyte degranulation in syntaxin-11 deficient familial hemophagocytic lymphohistiocytosis 4 (FHL4) patients. *Blood*. 110: 1906-1915, 2007.
- [87] Voskoboinik I., Smyth M.J., Trapani J.A. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 6: 940-952, 2006.
- [88] Voskoboinik I., Thia M.C., Trapani J.A. A functional analysis of the putative polymorphisms A91V and N252S and 22 missense perforin mutations associated with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 105: 4700-4706, 2005.
- [89] Henter J.I., Arico M., Elinder G. et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: primary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 12: 417-433, 1998.
- [90] Patarca R., Saavedra R.A., Cantor H. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: role of early T-lymphocyte activation-1/ osteopontin gene. *Crit. Rev. Immunol*. 13: 225-246, 1993.

- [91] Rouslati E., Pierscbacher M.D. New perspectives in cell adesion: RGD and integrins. *Science*. 238: 491-7, 1987.
- [92] Bayless K.J., Davis G.E. Identification of dual alpha 4beta1 integrin binding sites within a 38 amino acid domain in the N-terminal thrombin fragment of human osteopontin. *J Biol Chem*. 276: 13483-13489, 2001.
- [93] Barry S.T., Ludbook S.B., Murrison E. et al. A regulated interaction between alpha5beta1 integrin and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun*. 267: 764-769, 2000.
- [94] Smith L.L., Greenfield B.W., Aruffo A. et al. CD44 is not an adhesive receptor for osteopontin. *J Cell Biochem*. 73: 20-30, 1999.
- [95] Duong L.T., Rodan G.A. Integrin-mediated signaling in the regulation of osteoclast adhesion and activation. *Front Biosci*. 3: 1757-1768, 1998.
- [96] Smith L.L., Cheung H.K., Ling L.E. et al. Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognised by alpha9beta1 integrin. *J biol Chem*. 271: 28485-28491, 1996.
- [97] Wong A., Hwang S.M., NcDevitt P. et al. Studies on alpha v beta 3/ligand interactions using a [3H]SK&F-107260 binding assay. *Mol Pharmacol*. 50: 529-537, 1996.
- [98] Liaw L., Linder V., Schwartz S.M. et al. Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro. *Circ Res*. 77: 665-672, 1995.
- [99] Mazzali M., Kipari T., Ophascharoensuk V. et al. Osteopontin--a molecule for all seasons. *QJM*. 95: 3-13, 2002.
- [100] Denhardt D.T., Burger E.H., Kazanecki C. et al. Osteopontin-deficient bone cells are defective in their ability to produce no in response to pulsatile fluid flow *Biochem Biophys. Res Commun*. 288: 448-453, 2001.

- [101] Yokasaki Y., Sheppard D. Mapping of the cryptic integrin-binding site in osteopontin suggests a new mechanism by which thrombin can regulate inflammation and tissue repair. *Trends Cardiovasc Med.* 10: 155-59, 2000.
- [102] O'Regan A., Berman J.S. Osteopontin: a key cytokine in cellmediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol.* 81: 373-390, 2000.
- [103] Katagiri Y.U., Sleeman J., Fujii H. et al. CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res.* 59: 219-226, 1999.
- [104] Weber G.F., Ashkar S., Glimcher M.J. et al. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1) *Science* 271: 509-512, 1996.
- [105] Agnihotri R., Crawford H.C., Haro H. et al. Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). *J Biol Chem.* 276: 28261-28267, 2001.
- [106] Philip S., Bulbule A., Kundu G.C. Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells. *J Biol Chem* 276: 44926-44935, 2001.
- [107] Williams S., Barnes J., Wakisaka A. et al. Treatment of osteoporosis with MMP inhibitors. *Ann N Y Acad Sci.* 878: 191-200, 1999.
- [108] Young M.F., Kerr J.M., Thermane J.D. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics.* 7: 491-502, 1990.
- [109] Giacomelli F., Marciano R., Pistorio A. et al. Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity. *Physiol. Genomics.* 20: 87-96, 2004.

- [110] Denhart D.T., Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl.* 30-31: 92-102, 1998.
- [111] McCauley L.K. Transgenic mouse models of metabolic bone disease. *Curr Opin Rheumatol.* 13: 316-25,2001.
- [112] Carlson I., Tognazzi K., Manseau E.J. et al. Osteopontin is strongly expressed by histiocytes in granulomas of diverse etiology. *Lab Invest.* 77: 103-108, 1997.
- [113] O'Brien E.R., Garvin M.R., Stewart D.K. et al. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb.* 14: 1648-1656, 1994.
- [114] O'Regan A.W., Hayden J.M., Berman J.S. Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol.* 68(4): 495-502, 2000.
- [115] Katagiri Y., Mori K., Hara T. et al. Functional analysis of the osteopontin molecule. *Ann N Y Acad Sci.* 760: 371-374, 1995.
- [116] Ashkar S., Weber G.F., Panoutsakopoulou V. et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science.* 287: 860-864, 2000.
- [117] Reinholt F.P., Hulthén K., Oldberg A. et al. Osteopontin: a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Nat Acad Sci. USA* 87: 4473-4475, 1990.
- [118] Yoshitake H., Rittling S.R., Denhardt D.T. et al. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 8156-60, 1999.
- [119] Masutani K., Akahoshi M., Tsuruya K. et al. Predominance of Th1 immune response in diffuse proliferative lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 44: 2097-2106, 2001.

- [120] Adler B., Ashkar S., Cantor H. et al. Costimulation by extracellular matrix proteins determines the response to TCR ligation. *Cell Immunol.*210: 30-40, 2001.
- [121] Akahoshi M., Nakashima H., Tanaka Y. et al. Th1/Th2 balance of periferal T helper cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 42: 1644-1648, 1999.
- [122] Nagai S., Hashimoto S., Yamashita T. et al. Comprehneseive gene expression profile of human activated T(h)1-and T(h)2-polarized cells. *Int Immunol.* 13: 367-376, 2001.
- [123] Hur E.M., Youssef S., Haws M.E. et al. Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nature Immunology.*8: 74-83, 2007.
- [124] Iizuka J., Katagiri Y., Tada N. et al. Introduction of an osteopontin gene confers the increase in B1 cell population and the production of anti-DNA autoantibodies. *Lab Invest.* 78: 1523-1533, 1998.
- [125] Chiocchetti A., Comi C., Indelicato M. et al. Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *J Neuroimmunol.* 163: 172-178, 2005.
- [126] Blom T., Franzen A., Heinegard D. et al. Comment on 'The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease.' *Science.* 299: 1845, 2003.
- [127] Mishima R., Takeshima F., Sawai T. et al. High plasma osteopontin levels in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol;* 41: 167-172, 2007.
- [128] Clementi R., Dagna L., Dianzani U. et al. Inherited perforin and Fas mutations in a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome and lymphoma. *New Eng J Med.* 351: 1419-1424, 2004.
- [129] Clementi R., Locatelli F., Dupre L. et al. A proportion of patients with lymphoma may harbor mutations of the perforin gene. *Blood.* 105: 4424-4428, 2005.

- [130] Poppema S., Maggio E., van den Berg A. Development of lymphoma in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) and its relationship to Fas gene mutations. *Leuk Lymphoma*. 45: 423-31, 2004
- [131] Trambas C., Gallo F., Pende D. et al. A single amino acid change, A91V, leads to conformational changes that can impair processing to the active form of perforin. *Blood* 106: 932-937, 2005.
- [132] Risma K.A., Frayer R.W., Filipovich A.H. et al. Aberrant maturation of mutant perforin underlies the clinical diversity of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Clin Invest* 116: 182-192, 2006.
- [133] Molleran Lee S., Villanueva J., Sumegi J. et al. Characterisation of diverse PRF1 mutations leading to decreased natural killer cell activity in North American families with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet* 41: 137-144, 2004.
- [134] Rieux-Laucat F., Le Deist F., De Saint Basile G. Autoimmune lymphoproliferative syndrome and perforin. *N Engl J Med*. 352:306-307, 2005.
- [135] Chiocchetti A., Indelicato M., Bensi T. et al. High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 103: 1376–1382, 2004.
- [136] D'Alfonso S., Barizzone N., Giordano M. et al. Two single nucleotide polymorphisms in the 5' and 3' ends of the osteopontin gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 52: 539-547, 2005.
- [137] Marciano R., D'Annunzio G., Minuto N. et al. Association of alleles at polymorphic sites in the osteopontin encoding gene in young type 1 diabetic patients. *Clin Immunol* , 2009 [Epub ahead of print].