

Università degli Studi del Piemonte Orientale

“Amedeo Avogadro”

Dipartimento di Scienze Mediche



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare

Ciclo XXII (2006-2009)

***VARIAZIONI NEI GENI DI PERFORINA E SAP
COINVOLTI NELLO SVILUPPO
DELL'AUTOIMMUNITA'***

Relatore: Prof. Umberto Dianzani

Candidato: Dr.ssa Sara Bocca

Alla mia Famiglia...

INDICE

RIASSUNTO	6
ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI	10
ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI	11
INTRODUZIONE	12
1. Autoimmunità	12
1.1. <i>Eziologia e patogenesi delle malattie autoimmuni</i>	12
1.2. <i>Fattori ambientali</i>	13
1.3. <i>Predisposizione genetica</i>	15
1.3.1. <i>Associazione col sesso</i>	16
1.3.2. <i>Associazione con l'aplotipoHLA</i>	17
2. La sindrome autoimmune linfoproliferativa	18
2.1. <i>Autoimmunità e difetti genetici ereditari della funzione di Fas</i>	18
2.2. <i>Il modello dei topi MRL lpr e gld</i>	18
2.3. <i>La sindrome autoimmune linfoproliferativa</i>	19
2.4. <i>La Malattia Autoimmune Linfoproliferativa di Dianzani (DALD), una variante di ALPS</i>	22
2.5. <i>Coinvolgimento dei difetti funzionali di Fas nello sviluppo di malattie autoimmuni comuni</i>	23
3. La Sclerosi Multipla	24
3.1. <i>Epidemiologia</i>	24
3.2. <i>Fattori genetici</i>	26
3.3. <i>Fattori virali</i>	28
3.4. <i>Fattori immunologici</i>	30

3.5 Patogenesi	32
4. Perforina	35
4.1. Struttura e funzione	35
4.2. Deficit di perforina nella Linfoistiocitosi Emofagocitica Familiare	37
4.3 Difetti del gene di perforina nella ALPS e nel T1DM	38
5. SAP	40
5.1. Struttura e meccanismo d'azione	40
5.2. SAP e l'autoimmunità	44
SCOPO GENERALE DELLA TESI	45
SEZIONE 1	46
6. Perforina e la Sclerosi Multipla	46
6.1. Materiali e metodi	47
6.1.1 Pazienti	47
6.1.2 Ricerca di variazioni nel gene di perforina	48
6.1.3 PCR allele-specifica	49
6.1.4 Saggio di citotossicità	49
6.1.5 Analisi statistica	50
6.2 Risultati	50
6.2.1 Ricerca di variazioni nucleotidiche nell'intera sequenza codificante di PRF1	50
6.2.2 Ricerca della variazione nucleotidica A91V in una seconda popolazione di pazienti e controlli	54
6.3 Discussione	55

SEZIONE 2	60
7. SAP e l'ALPS	60
7.1 <i>Materiali e metodi</i>	61
7.1.1 <i>Pazienti</i>	61
7.1.2 <i>Ricerca di variazioni in SH2D1A</i>	61
7.1.3 <i>Screening funzionale</i>	62
7.1.4 <i>Real Time PCR</i>	62
7.1.5 <i>Analisi della metilazione</i>	62
7.1.6 <i>Analisi statistica</i>	63
7.2 <i>Risultati</i>	64
7.2.1 <i>Ricerca di variazioni nel gene di SAP in pazienti con ALPS/DALD</i>	64
7.2.2 <i>Analisi funzionale di -346C/T</i>	68
7.3 <i>Discussione</i>	71
CONCLUSIONI GENERALI DELLA TESI	76
BIBLIOGRAFIA	78

RIASSUNTO

Le malattie autoimmuni sono dovute all'inefficienza o all'inattivazione dei normali meccanismi di mantenimento della tolleranza verso il *self* da parte del sistema immunitario. Sono malattie multifattoriali che si sviluppano in soggetti geneticamente predisposti in seguito all'azione di fattori scatenanti di tipo ambientale. 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*.

Una delle malattie in cui è maggiore l'evidenza del coinvolgimento di difetti genetici a carico dello spegnimento della risposta immunitaria è la Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS), causata da difettiva funzionalità del recettore di morte Fas e caratterizzata dall'accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari, da autoimmunità ematologiche ed espansione dei linfociti T TCR $\alpha\beta$ positivi doppi negativi (DN) per CD4 e CD8; questa espansione è assente in una variante della malattia detta Malattia Autoimmune Linfoproliferativa di Dianzani (DALD). Sebbene l'ALPS sia causata generalmente da mutazioni a carico del gene di Fas, la penetranza incompleta di queste mutazioni ha permesso di identificare altri geni le cui variazioni possono favorire un substrato genetico per lo sviluppo della malattia. Ad esempio, è stato dimostrato che lo sviluppo della malattia è favorito da due varianti nucleotidiche (A91V e N252S) del gene di perforina (*PRF1*)

attraverso diversi meccanismi mediati da una riduzione dell'efficienza della citotossicità cellulo-mediata.

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 Demielinizzante Infiammatoria Cronica (CIDP). Scopo di questa tesi è l'identificazione di ulteriori fattori genetici predisponenti per l'ALPS e valutare il ruolo di altri geni nello sviluppo della SM. I risultati hanno permesso di identificare in variazioni del gene di perforina (*PRF1*) un nuovo fattore predisponente per la SM e di osservare che variazioni del gene di *SAP* sono anche coinvolte nello sviluppo dell'ALPS.

- ✓ ***Ruolo di PRF1 in SM.*** 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-alleliche di *PRF1* causano la Linfoistocitosi Emofagocitica Familiare (FHL), una immunodeficienza ereditaria a carico della citotossicità cellulo-mediata, che si accompagna ad aspetti linfoproliferativi. Studi precedenti hanno dimostrato come due variazioni nucleotidiche (A91V e N252S), di per sé insufficienti a causare la FHL2, possano agire come fattori predisponenti per lo sviluppo dell'ALPS. Queste premesse ci hanno indotto a valutare il ruolo di *PRF1* anche in altre malattie autoimmuni come la SM. L'intera porzione codificante di *PRF1* è stata sequenziata in 190 pazienti SM e 268 controlli, identificando le variazioni nucleotidiche A91V e N252S in entrambi i gruppi e sei nuove mutazioni (C999T, G1065A, G1428A, A1620G, G719A, C1069T) solo nei pazienti. Nel loro insieme, la frequenza allelica di queste variazioni è

risultata essere maggiore nei pazienti rispetto che ai controlli (17% vs 9%, $p = 0.0016$), conferendo un aumento di circa due volte del rischio di sviluppare la malattia (OR = 2.06, 95% CI: 1.13-3.77). Poiché la variazione A91V risultava già da sola essere più frequente nei pazienti che nei controlli (7.6% vs 4.3%, $p = 0.044$), abbiamo valutato la sua frequenza in una seconda popolazione di 966 pazienti e 1.520 controlli. I risultati ottenuti hanno mostrato che la frequenza allelica dell'A91V è significativamente più alta nei pazienti rispetto ai controlli anche nella seconda popolazione (7.5% vs 5.8%, $p = 0.019$). L'OR conferito da A91V calcolato nel gruppo complessivo di 1156 pazienti e 1788 controlli è risultato essere di 1.38 (95%CI=1.10-1.74).

- ✓ **Ruolo di SAP nell'ALPS.** *SAP* è un adattatore molecolare coinvolto nella trasduzione del segnale e nell'attivazione dei linfociti. Il suo gene è localizzato sul cromosoma X e sue mutazioni causano la sindrome di Duncan (XLP: X-linked lymphoproliferative disease), immunodeficienza ereditaria, caratterizzata da una difettosa risposta immune nei confronti dell'infezione da EBV (Epstein Barr Virus) in conseguenza di una ridotta attivazione delle cellule natural killer (NK). Dati in letteratura hanno suggerito che *SAP* possa anche essere coinvolto in alcune malattie autoimmuni. In particolare è stato dimostrato che nel modello murino dell'ALPS rappresentato dai topi *MRLlpr*, causato da mutazioni omozigoti del gene di Fas, la gravità della malattia è notevolmente ridotta da mutazioni deleterie a carico del gene di *SAP*. Questi dati ci hanno indotto a studiare il gene di *SAP* in pazienti affetti da ALPS o DALD. La regione corrispondente al promotore di *SAP* è stata sequenziata in 41 pazienti con ALPS o DALD e 535 controlli; sono stati identificati tre polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs), -631 A/G, -494 A/G e -346 C/T, localizzati nel promotore del gene e in stretto linkage disequilibrium tra loro. Una analisi in silico, ha evidenziato come l'allele -346C può essere un sito di

metilazione. Questa possibilità è stata confermata attraverso il metodo della PCR (MSP) ed esperimenti condotti in RealTime PCR hanno evidenziato una maggior espressione del mRNA di *SAP* nei soggetti portatori dell'allele -346T (sito non metilabile) rispetto ai portatori di -346C (sito metilabile). L'allele -346T è risultato significativamente più frequente nei pazienti con ALPS o DALD rispetto ai controlli (57% vs 37%; $p=0.00036$) conferendo un OR=2.30 (95% CI: 1.43-3.72). Suddividendo la popolazione per sesso si evidenzia come questa differenza sia prevalentemente a carico dei soggetti maschi (67% vs 36%; $p=0.0035$) nei quali -346T conferisce un OR=3.50 (95% CI: 1.44-8.68).

Nel complesso questi risultati dimostrano che variazioni nei geni di *PRF1* e *SAP* agiscono come fattori di predisposizione allo sviluppo della SM e dell'ALPS.

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] D'Alfonso S, Bolognesi E, Guerini FR, Barizzone N, **Bocca S**, Ferrante D, Castelli L, Bergamaschi L, Agliardi C, Ferrante P, Naldi P, Leone M, Caputo D, Ballerini C, Salvetti M, Galimberti D, Massacesi L, Trojano M, Momigliano-Richiardi P. A sequence variation in the MOG gene is involved in multiple sclerosis susceptibility in Italy. *Genes Immun.* 2008 Jan;9(1):7-15.
- [3] Boggio E., Indelicato M., Orilieri E., **Bocca S**, Mesturini R., Sarasso C., Mazzarino MC., Campagnoli MF., Ramenghi U., Dianzani U. and Chiocchetti A. Role of TIMP-1 in development of autoimmunity-lymphoproliferation *submitted.*

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

ALPS: Sindrome autoimmune linfoproliferativa
AR: Artrite reumatoide
DALD: Malattia Autoimmune Linfoproliferativa di Dianzani
DN: Doppi negativi
EAE: Encefalomielite sperimentale autoimmune
EBV: Virus di Epstein Barr
FHL: Linfoistiocitosi Emofagocitica Familiare
GAPDH: Gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi
HLA: Antigeni leucocitari umani
IL: Interleuchina
MAG: Glicoproteina associata alla mielina
MHC: Complesso maggiore di istocompatibilità
OPN: Osteopontina
PBMC: Cellule mononucleate del sangue periferico
PHA: Fitoemoagglutinina
PLP: proteina proteo lipidica
PP: Sclerosi Multipla Primariamente Progressiva
PRF1: Perforina
RR: Sclerosi Multipla Remittente
SAP: Proteina associata a SLAM
SH2D1A: Src Homology 2 Domain 1A containing protein
SLAM: Signalling lymphocyte activation molecule
SM: Sclerosi multipla
SP: Sclerosi Multipla Secondariamente Progressiva
T1DM: diabete mellito di tipo 1
TCR: recettore dei linfociti T
XLP: Malattia linfoproliferativa associata al cromosoma X

INTRODUZIONE

1. L'AUTOIMMUNITA'

1.1 Eziologia 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 e producesse danni tissutali (“*horrors autotopicus*”).

Oggi sappiamo che i sistemi di tolleranza al *self*, che normalmente proteggono ciascun individuo dai linfociti potenzialmente autoreattivi, possono in certi casi fallire. Questi fallimenti portano allo sviluppo di una risposta inappropriata del sistema immunitario contro tessuti *self*, fenomeno detto **autoimmunità**.

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 nei soggetti sani normali.

Poiché la presenza di queste cellule non porta inevitabilmente allo sviluppo di manifestazioni autoimmuni, la loro attività deve essere regolata attraverso meccanismi tollerogenici attivi in periferia. L'alterazione di questi meccanismi può portare all'attivazione di cloni di linfociti autoreattivi e al conseguente sviluppo di reazioni umorali o cellulari contro antigeni *self*.

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:

- 1) 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.
- 2) L'infezione può danneggiare i tessuti causando la liberazione di antigeni normalmente sequestrati, che non sono mai stati visti dal sistema immunitario e che sono quindi erroneamente riconosciuti come non *self*.
- 3) Infine il processo infiammatorio cronico locale innescato dall'infezione nel tessuto, determina 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 potrà 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. Infatti nel corso della malattia, si passa da una fase

iniziale, dove la risposta immune è diretta verso un singolo epitopo di una proteina *self*, ad una risposta autoimmune più vasta indirizzata sia verso epitopi diversi della stessa proteina sia verso proteine diverse (“espansione epitopica”).

Dal punto di vista clinico le malattie autoimmuni possono essere divise in due grandi categorie: quelle organo-specifiche come la Sclerosi Multipla (SM), il Diabete mellito di Tipo 1 (T1DM), la tiroidite di Hashimoto, e quelle sistemiche come il Lupus Eritematoso Sistemico (LES) e la Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS).

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 aggreiscono 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 una enorme mole di 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 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

sesto e l'aplotipo HLA (human leukocyte antigens). 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 molto più frequenti nelle femmine piuttosto che nei maschi. 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 altri steroidi, come il cortisone, hanno un effetto molto potente. Inoltre altri ormoni espressi diversamente nel maschio e nella femmina, come la prolattina, hanno effetto sui linfociti, come dimostrato dal fatto che il recettore per la prolattina è espresso dai linfociti sia T sia B e che 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: 1) favorisce le risposte anticorpali di tipo IgG, che sono protettive per il feto dal momento che le IgG superano la barriera placentare; 2) riduce le risposte cellulo-mediate che potrebbero invece aggredire la placenta, che è un organo *non self*. In effetti alcune forme di aborto precoce ricorrente sono state attribuite ad una eccessiva risposta TH1 o CTL contro la placenta che è un organo *non self*.

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'innesco 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 molecole HLA di classe II, anche se in alcuni casi è stata descritta l'associazione con molecole 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 DR2; quella di sviluppare miastenia grave è 5 volte maggiore nei portatori di DR3. L'associazione più stretta è però stata osservata nella *spondilite anchilosante*, il cui rischio di sviluppo è 90 volte superiore in soggetti portatori della molecola 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 MHC 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) linfoadenopatia, 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 Autoimmune Linfoproliferativa (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 e negli organi linfatici secondari [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. LA SCLEROSI MULTIPLA (SM)

3.1 Epidemiologia

La Sclerosi Multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica del sistema nervoso centrale (SNC). Se si escludono i traumi, è la causa più frequentemente responsabile di disabilità neurologica nei giovani adulti. E' più frequente nel sesso femminile e il rapporto femmine/maschi varia da 1,9 a 3,1. L'esordio è raro prima dell'adolescenza situandosi in genere fra i 20 e i 45 anni, con un picco d'incidenza per età intorno ai 30 anni.

E' diffusa in tutto il mondo, ma numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato una disomogeneità nella sua distribuzione geografica.

Si possono individuare zone ad alto rischio, con tassi di prevalenza uguali o superiori a 30 casi di SM definita per 100000 abitanti, comprendenti gli USA settentrionali, il Canada meridionale, l'Europa centro-settentrionale, l'Australia sud-orientale e la Nuova Zelanda; zone a medio rischio, con tassi compresi tra 5-25/100000, comprendenti l'Europa mediterranea, gli USA meridionali la popolazione bianca del Sud Africa; ed infine, zone a basso rischio, con tassi inferiori a 5/100000, comprendenti Asia, Africa, gli stati settentrionali del Sud America e i Carabi. In Italia la prevalenza è di 20/100000 con un numero totale di pazienti stimato di circa 50000, con la più alta prevalenza in Sicilia e Sardegna.

La causa della SM non è ancora stata chiarita, e diversi studi suggeriscono si tratti di una patologia multifattoriale che dipende da fattori ambientali, genetici, immunologici.

Il decorso della SM presenta caratteristiche variabili ed imprevedibili.

Si distinguono tre tipi fondamentali di SM in relazione al decorso della malattia:

- a) Relapsing-Remitting (RR): è la forma di SM più frequente che interessa più dell'80% dei pazienti. E' caratterizzata da attacchi acuti con successive remissioni. Nella fase iniziale della malattia i sintomi possono mancare completamente, a volte addirittura per molti anni. Non è però possibile prevedere un attacco acuto e i sintomi possono manifestarsi in ogni momento. Possono comparire improvvisamente sintomi nuovi o già noti, che durano pochi giorni o qualche settimana per poi scomparire di nuovo. Tra un episodio e l'altro sembra che la malattia non progredisca.
- b) Secondary Progressive (SP): questa variante della SM viene considerata come un secondo stadio della malattia. Nel 40% circa dei pazienti la forma RR prima o poi si trasforma in SM secondaria progressiva. Si osservano attacchi acuti isolati, come nella RR, ma la regressione non è completa e tra un attacco e l'altro l'invalidità progredisce. Con il tempo il numero di attacchi acuti si riduce mentre il grado di invalidità aumenta progressivamente.
- c) Primary Progressive (PP): questa forma di SM è rara e colpisce solo il 10 % circa di tutti i pazienti con SM. I sintomi tendono a peggiorare con il tempo fin dall'inizio e l'invalidità aumenta progressivamente. Mancano gli episodici attacchi acuti, così come le remissioni. Solo occasionalmente si assiste a piccoli miglioramenti transitori.

Accanto a queste forme ne troviamo altre due: la forma benigna, è caratterizzata da un recupero completo dopo uno o due recidive e non causa deficit permanenti. La diagnosi di SM di tipo benigno è molto difficile e può avvenire solo dopo 10-15 anni dall'esordio dei primi sintomi; questa forma è associata a sintomi meno severi generalmente legati ad una alterazione della sensibilità; e la forma progressivo-recidivante caratterizzata, invece, da un decorso progressivo fin dall'esordio, con recidive seguite o meno da recupero. Gli intervalli tra una ricaduta e l'altra sono caratterizzati da una continua progressione della malattia, a differenza della forma RR dove l'intervallo che intercorre tra due ricadute è privo di progressione.

3.2 Fattori genetici

L'esistenza di una suscettibilità geneticamente determinata a contrarre la malattia è suggerita principalmente da studi epidemiologici condotti in popolazioni di origine nordeuropea. È stato osservato che la concordanza tra gemelli monozigoti è del 25-30%, circa 9 volte maggiore rispetto a quella dei gemelli dizigoti (4%) [26,27]. Questa elevata incidenza tra i gemelli monozigoti dimostra il ruolo dei fattori genetici nell'etiologia della malattia, sebbene il 70% di discordanza sottolinei l'importanza dei fattori ambientali.

La rilevanza di una suscettibilità genetica viene anche confermata da una incrementata incidenza familiare: circa il 15% dei casi di SM hanno un familiare o un parente affetto; il rischio di contrarre la malattia è più alto nei fratelli di soggetti con SM e gradualmente diminuisce nei figli e più ancora nei cugini. Si può ritenere che per parenti di primo grado esista un rischio di circa l'1-3% di contrarre la malattia rispetto al rischio di 1/1000-2000 nella popolazione generale. Tale incidenza potrebbe essere in parte dovuta a fattori ambientali più uniformi nell'ambito di uno stesso nucleo, ma dati ottenuti in coniugi e figli adottati, suggeriscono che fattori ambientali familiari non incidono sostanzialmente sull'aggregazione familiare della SM.

Studi di linkage hanno evidenziato come il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) sul cromosoma 6 rappresenti un determinante antigenico della SM [28,29]. Tale complesso codifica per gli antigeni di istocompatibilità (sistema HLA) che presentano l'antigene ai linfociti T. La regione di classe II (HLA-D) dell'MHC presenta la più stretta associazione con la SM e la suscettibilità genetica sembra essere dovuta alla presenza dell'allele DR2 e del relativo aplotipo, definito sulla base di criteri molecolari come DRB1*1501, DQA1*0102, DQB1*0602.

I tentativi di localizzare più precisamente il gene di suscettibilità all'interno della regione DR-DQ, sono stati infruttuosi a causa del notevole "linkage disequilibrium" in questa regione.

Nella popolazione caucasica la malattia è spesso associata agli alplotipi HLA-DR2 e DQW1 del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II. In altre etnie tuttavia la malattia è associata a differenti alplotipi HLA, quali ad es., in Sardegna, all'HLA -DR4 e DQW3.

Tre ulteriori alleli sono stati associati recentemente da gruppi differenti, HLA-A*2, HLA-C*05 e MOG-L142, conferendo tutti un effetto protettivo tra 0.49 e 0.7 indipendentemente dal linkage disequilibrium con gli alleli DR [30-32].

Oltre alla regione HLA, alcuni studi hanno ipotizzato l'esistenza di altri geni di suscettibilità, tra cui quello per la catena β del TCR sul cromosoma 7 [33], quello per la catena pesante delle immunoglobuline sul cromosoma 19, un gene correlato alla proteina basica della mielina sul cromosoma 18 [34], ma per nessuno di questi è stata mostrata una associazione significativa.

Studi di linkage in alcune popolazioni, hanno evidenziato la presenza di polimorfismi di diverse molecole tra cui IL-10, IL-1, l'apolipoproteina E, CTLA4 che pur non associandosi alla suscettibilità per la malattia rappresentano un fattore di rischio per sviluppare un quadro clinico più severo [35-37].

Uno studio di genome wide su 300.000 SNPs ha identificato una forte associazione con due SNPs intronici del gene per la catena alpha del recettore dell'interleuchina 2 (IL2RA) ($p=2.9 \times 10^{-8}$) e uno SNP non sinonimo (T244I, rs6897932) nel gene per la catena alpha del recettore dell'interleuchina 7 (IL7RA) ($p=2.9 \times 10^{-7}$) [38].

Nuove informazioni sulla genetica della SM giungono da tecnologie d'avanguardia come i microarrays. Con questa tecnica, infatti, Steinman et al. hanno indicato la citochina osteopontina (OPN) come gene sovraespresso nella malattia [39]. Studi recenti, hanno

evidenziato che alcuni alleli del gene di OPN e alcuni aplotipi del gene di ICOS sono capaci di favorire lo sviluppo della SM [40-41].

3.3 Fattori virali

Per molti anni l'ipotesi infettiva, in particolare virale, è stata considerata importante nella genesi della SM sulla base di osservazioni epidemiologiche e di caratteristiche patologiche della malattia.

Numerosi dati suggeriscono il ruolo di un agente virale nella patogenesi della SM: a) l'evidenza epidemiologica di una esposizione ad agenti infettivi nel periodo dell'infanzia e dell'adolescenza; b) l'induzione di esacerbazioni della malattia da parte di infezioni virali [42]; c) la distribuzione geografica della suscettibilità alla SM [43] ; d) gli studi di migrazione da e verso aree ad alta suscettibilità; e) la ridotta risposta immune verso virus [44]; f) analogie con modelli animali e altre patologie umane in cui i virus sono responsabili di malattie a lunga incubazione, demielinizzanti e con andamento recidivante–remittente.

Come accennato, la suscettibilità alla SM segue una distribuzione geografica con un aumento di prevalenza all'aumentare della latitudine che potrebbe suggerire la rilevanza di fattori ambientali e genetici.

Studi di migrazione condotti prevalentemente su Europei immigrati in Sud Africa, Israele, Hawaii [45,46] dimostrano che le popolazioni migranti tendono a conservare il rischio della zona di origine quando la migrazione avviene dopo il 15° anno di vita, mentre al contrario acquistano il rischio del nuovo paese di residenza quando la migrazione avviene prima dei 15° anno di vita. Questi dati suggeriscono che fattori ambientali, forse virali, agiscono prima dei 15 anni per influenzare la suscettibilità alla SM.

Prove a favore di questa ipotesi patogenetica si ricavano anche da dati relativi ad epidemie di SM. Storica è quella che si è verificata nelle isole Faroe, dove la malattia era sconosciuta fino al 1940 e dove si sono avuti numerosi casi durante e subito dopo la seconda guerra mondiale, in concomitanza con l'occupazione da parte delle truppe britanniche. L'improvvisa comparsa della SM in questa popolazione suggerisce una trasmissione interumana o comunque l'importanza di agenti infettivi [47]. Altri casi di epidemie sono stati descritti nelle isole Shetland-Orkney, Iceland, Key West Florida, Mossyrock Washington e Mansfield Massachusetts [48].

L'associazione di virus con patologie demielinizzanti sono prove a favore di una possibile influenza virale nello sviluppo di SM; in particolare indicano che i virus sono in grado di causare demielinizzazione e possono persistere per anni nel SNC inducendo una patologia cronica molti anni dopo l'infezione acuta.

Tra i virus chiamati in causa nella genesi della SM troviamo il virus del morbillo, l'herpesvirus simplex (HHV-1), l'herpesvirus umano 6 (HHV-6), il virus Epstein-Barr, il Rubivirus, il virus Parainfluenzae, il retrovirus HTLV, il retrovirus associato alla sclerosi multipla (MSRV), mentre tra i microrganismi non virali abbiamo l'Acanthamoeba, la Borrelia, la Brucella, il Campylobacter, la Chlamydia pneumoniae. Per questi patogeni è stata ipotizzata un'associazione con la SM sulla base di studi che indicano aumenti del titolo anticorpale sierico e liquorale contro questi microrganismi nei pazienti con SM rispetto ai controlli sani [49-52].

Il ruolo di questi patogeni nella genesi della SM rimane sconosciuto. E' possibile che l'agente iniziale possa essere virale, ma anche in tale eventualità si pensa che intervengano successivamente meccanismi autoimmuni responsabili del danno tissutale e della cronicizzazione della malattia. Alcuni virus e batteri possiedono determinanti antigenici identici o simili a normali componenti delle cellule. E' pertanto possibile che una reazione

immunitaria scatenata contro il virus possa poi cross-reagire contro i componenti *self* antigenicamente simili a quelli virali. Questo fenomeno noto come “mimetismo molecolare” potrebbe rappresentare uno dei meccanismi capaci di innescare la risposta autoimmune. Per esempio, l’encefalite allergica sperimentale (EAE) viene indotta immunizzando l’animale con proteine della mielina ed è mediata dai linfociti CD4+ reattivi verso la MBP [53]. La MBP condivide omologie di sequenza con proteine prodotte dai virus del morbillo, dell’influenza e dell’adenovirus.

Purtroppo la ricerca di un virus che si associ inequivocabilmente alla SM non ha portato risultati. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che non esiste un solo virus che induce la malattia oppure che questo non è stato ancora identificato [54].

In alternativa, si può pensare che un patogeno ubiquitario possa agire come agente scatenante che contribuisce all’insorgere ed al perpetuarsi di fenomeni di autoaggressione del sistema immunitario in individui geneticamente predisposti.

3.4 Fattori immunologici

Un insieme di dati clinici e sperimentali supportano l’ipotesi che la SM sia una malattia a genesi autoimmune. In particolare questa ipotesi si fonda sulle seguenti osservazioni: a) nel contesto delle lesioni demielinizzanti sono presenti cellule infiammatorie [55,56]; b) la suscettibilità alla malattia è legata a geni importanti per il controllo della risposta immunitaria [57]; c) il decorso della malattia può essere modificato da terapie immunomodulanti [58,59]; d) si riscontrano alterazioni immunitarie quali la presenza di anticorpi oligoclonali nel liquor [60].

Una delle indicazioni più attendibili in favore di questa ipotesi è costituita dalle analogie cliniche e neuropatologiche con l’EAE [61].

L'EAE viene indotta attivamente, immunizzando l'animale suscettibile con proteine della mielina, oppure passivamente attraverso il trasferimento adottivo di linfociti T encefalitogeni specifici per tali proteine [62,63]. E' mediata dai linfociti T CD4+ reattivi verso un epitopo dominante della proteina basica della MBP nell'ambito del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II.

Numerosi dati indicano che queste cellule appartengano alla popolazione linfocitaria TH1, caratterizzata dalla secrezione delle citochine proinfiammatorie IL-2, INF- γ , TNF- α . Al contrario, si ottiene un beneficio terapeutico in molti modelli animali di EAE bloccando la via di trasduzione mediata dal TNF- α e polarizzando le cellule verso un fenotipo TH2.

Nonostante ciò, recenti studi hanno dimostrato come l'EAE e la SM non siano un esempio di univoca risposta Th-mediata, ma che il meccanismo alla base sia più complesso. Infatti topi knockout per INF- γ o per TNF- α sviluppano comunque una EAE anche se con una suscettibilità e severità diverse dai topi wild-type [64,65].

Nell'uomo i risultati ottenuti dall'analisi molecolare della risposta T contro la MBP, hanno evidenziato che numerose porzioni della proteina possono essere riconosciute, nell'ambito di diverse molecole del complesso maggiore di istocompatibilità, da molteplici famiglie del TCR. Tali risultati, che discordano da quanto osservato nella EAE in cui la risposta immune è diretta contro un epitopo immunodominante, probabilmente sono dovuti alla profonda differenza genetica tra i roditori di laboratorio (ceppi "inbred") e l'uomo (specie "outbred"). Gli interventi sperimentali di terapia immunologica nell'uomo si sono focalizzati sul blocco dei cloni T CD4+ contro le proteine della mielina, polarizzando le cellule verso un fenotipo TH2 o bloccando la trasduzione del segnale via TNF. Queste strategie molto efficienti nel classico modello EAE, non sono altrettanto valide nell'uomo peggiorando a volte il corso della SM [66,67].

Anche i meccanismi umorali dell'immunità sembrano essere coinvolti nel danno nervoso. Nei pazienti con SM sono state documentate risposte anticorpali nei confronti di MBP, la glicoproteina associata alla mielina (MAG), la proteina proteo lipidica (PLP) e l' α -B cristallina [68]. Si ritiene che ogni iniziale risposta dei linfociti T verso un autoantigene può innescare successivamente una risposta più diversificata contro altri autoantigeni, un fenomeno noto come "diffusione di epitopi".

L'importanza di una risposta umorale è indicata dalla presenza di immunoglobuline oligoclonali presenti nel liquor in più del 90% dei casi di SM pur non rappresentando una specificità di questa malattia dal momento che si possono trovare in molte altre patologie infiammatorie del SNC come anche infettive o autoimmuni.

Un ulteriore supporto all'origine autoimmune della malattia è scaturito da uno studio clinico effettuato somministrando INF γ [69]. Questa citochina, somministrata a malati di SM, ha determinato un marcato aumento delle ricadute verosimilmente perché l'INF γ induce l'espressione di antigeni di classe II su cellule residenti nel SNC facilitando la risposta autoimmune.

3.5 Patogenesi

E' universalmente accettato che il sistema immunitario svolga un ruolo chiave nella patogenesi della sclerosi multipla. Le prime evidenze indicavano i linfociti T CD4+ come mediatori chiave nella patogenesi della malattia, grazie a studi condotti sul modello animale murino (EAE) [70]. E' opinione comune che gli eventi iniziali dell'attivazione dei linfociti T avvengano in periferia dove i linfociti T incontrerebbero uno specifico autoantigene presentato da molecole del MHC II in presenza di segnali costimolatori come B7-1 e B7-2 sulle cellule presentanti l'antigene. Queste cellule autoreattive potrebbero essere presenti a

livello periferico come linfociti “quiescenti”, senza manifestare il proprio potenziale autoaggressivo. Uno stimolo esterno, possibilmente una malattia infettiva, potrebbe attivare questi linfociti. I potenziali meccanismi attraverso i quali eventi del genere potrebbero aver luogo includono: a) la “molecular mimicry”, la condivisione di epitopi tra un agente infettivo e molecole del SNC; b) un’attivazione policlonale da superantigene o di tipo “bystander” da citochine. In seguito alla loro attivazione i linfociti T CD4+ differenziano a cellule effettrici, mediatori del danno autoimmuni. Come già accennato si è tipicamente assegnato un ruolo chiave ai linfociti pro-infiammatori TH1, ma più recentemente è stato attribuito un ruolo chiave anche alla nuova popolazione pro-infiammatoria TH17, caratterizzata dalla secrezione di IL-17.

Affinché possa iniziare una risposta immunitaria locale a livello del SNC, i linfociti T circolanti attivati in periferia devono attraversare la barriera ematoencefalica.

Il processo di diapedesi attraverso questa struttura implica una complessa interazione tra a) molecole di adesione, b) chemochine, c) proteasi in grado di alterare la membrana basale e la matrice extracellulare [71].

Nella fase successiva, i macrofagi e la microglia giocano un ruolo chiave. Questi elementi agiscono come cellule presentanti l’antigene a livello locale, perpetuando la demielinizzazione immunomediata attraverso: a) la fagocitosi, b) il rilascio di citochine, c) l’attivazione di proteasi, d) il rilascio di mediatori tossici.

L’insieme della reazione infiammatoria che aggredisce la mielina a livello del SNC produce demielinizzazione e, successivamente, danno assonale che si suppone essere il correlato patologico del deficit neurologico irreversibile nella SM.

Dati recenti dimostrano un importante ruolo dei linfociti T CD8+ [72]; esiste infatti una significativa correlazione tra la presenza delle cellule CD8+ ed il danno assonale nelle lesioni sclerotiche [73]. Resta ancora da definire come i linfociti CD8+ contribuiscano alla

patogenesi della malattia. Studi su modelli animali hanno suggerito sia un ruolo da “mediatori” che da “soppressori” dell’infiammazione. Nel primo caso le cellule CD8+ danneggerebbero gli assoni direttamente a seguito del riconoscimento degli epitopi di classe I espressi in superficie dagli assoni stessi o indirettamente, distruggendo le cellule gliali che presentano epitopi di classe I, lasciando gli assoni esposti ad un’altra forma di infiammazione. Nel secondo caso invece il loro ruolo di “soppressori” si esplicherebbe nel diretto riconoscimento di molecole di classe I sulle cellule CD4+ [74]. Si ipotizza che il contributo dei linfociti CD8+ al danno assonale venga determinato dal rilascio di “mediatori” e una molecola chiave che potrebbe essere coinvolta in questo processo è perforina.

4. PERFORINA

4.1. Struttura e funzione

I linfociti T citotossici (CTL) e le cellule natural killer (NK) 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 delle cellule citotossiche 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 la cellula citotossica e la cellula 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 [75] 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 [76], 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'alfa 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 [77,78].

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 [79,80,81]. 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 [82].

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, che una volta processato all'estremità C-terminale rilascia circa 20 aminoacidi e si trasforma nella sua forma attiva [78].

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 1/50000 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, emodiluizione, 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. La FHL è geneticamente eterogenea: circa il 10% è associata al cromosoma 9q21-22 (FHL1), il 20-40% al cromosoma 10q21 (FHL2) [83,84]. Mentre il gene responsabile della FHL1 non è ancora noto, mutazioni del gene di perforina (*PRF1*) (localizzato in 10q21) sono responsabili della forma FHL2 [85]. Successivamente, nel 33% dei pazienti sono state identificate mutazioni nel gene di MUNC13-4 (FHL3) [86]. MUNC13-4, localizzato sul

cromosoma 17q25, codifica per una proteina citotossica coinvolta nel meccanismo dell'esocitosi di granuli. Infine, mutazioni nel gene di Syntaxina, che compromettono il rilascio dei granuli citotossici, sono responsabili della FHL4 [87]. Recentemente, mutazioni bialleliche nel gene STXBP2, sono state associate con una nuova variante della malattia (FHL5). Questo gene interagendo con Syntaxina 11 sembra essere coinvolto nel mantenimento del traffico vescicolare intracellulare [88]. Pazienti con FHL2 sono omozigoti o eterozigoti composti per mutazioni di *PRF1*; 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 [89]. 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 [90].

4.3 Difetti del gene di perforina nella ALPS e nel T1DM

La FHL2 è una malattia recessiva e i portatori di singole mutazioni eterozigoti del gene di perforina sono in genere sani. Tuttavia recenti dati ottenuti nel nostro laboratorio indicano che variazioni eterozigoti del gene di perforina possono agire da fattori di predisposizione per lo sviluppo di malattie autoimmuni. Questa possibilità è stata inizialmente suggerita per la ALPS/DALD in cui sono state identificate due variazioni di *PRF1*, A91V e N252S, che erano state in precedenza descritte nella FHL2 [91]. In particolare N252S aumentava di oltre 60 volte il rischio di sviluppare ALPS, mentre A91V aumentava di circa 3 volte il rischio di sviluppare DALD. Un lavoro successivo su pazienti con T1DM ha poi identificato un'associazione con N252S (che aumentava il rischio di T1DM di circa 7 volte) e ha identificato un paziente portatore di una mutazione nuova che causa la sostituzione aminoacidica P477A [92]. Poiché queste variazioni si associano a una ridotta funzionalità di

perforina, è stato proposto che difetti funzionali di perforina possano aumentare il rischio di sviluppo di queste malattie autoimmuni alterando lo spegnimento della risposta immunitaria mediato da perforina. Una ipotesi alternativa è che il difetto di perforina riduca la capacità dei linfociti citotossici di contrastare le infezioni virali e questo potrebbe favorire il mimetismo molecolare.

5. SAP (*Slam Associating Protein*)

5.1 Struttura e meccanismo d'azione

SAP (*Slam Associating Protein*), anche chiamata SH2D1A (*Src Homology 2 Domain 1A containing protein*), è una piccola proteina intracitoplasmatica di 15 kDa costituita da un singolo dominio SH2 e da una corta coda di 28 aminoacidi all'estremità C-terminale che presenta due tirosine fosforilabili [93]. Il gene che codifica per SAP fu identificato per clonaggio posizionale nel 1998, mappa sul cromosoma X in posizione Xq25-q26 è costituito da quattro esoni e tre introni e si estende per una regione di 25Kb.

La famiglia di SAP comprende tre membri: SAP, EAT2 (*Ewing's sarcoma-associated transcript-2*) e, nei roditori, ERT (*EAT2-related transducer*); a differenza di SAP gli altri due membri sono posizionati in tandem sul cromosoma 1 e si pensa si siano originati per duplicazione genica.

SAP è espresso sulle cellule T, NK, eosinofili, piastrine, mentre la sua espressione sulle cellule B è ancora controversa. EAT2, invece, è espresso sulle cellule NK, sulle cellule dendritiche (DC) e sui macrofagi.

SAP interviene nella trasduzione del segnale legandosi a SLAM (*Signalling lymphocyte activation molecule*); la famiglia di SLAM comprende sei recettori transmembrana appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline: SLAM (CD150); 2B4 (CD244), Ly-9 (CD229), NK-T-B (NTB-A o Ly-108), CD84, e CRACC. Con l'eccezione di 2B4, il cui ligando è CD48, tutti gli altri membri di questa famiglia di recettori sono auto-ligandi e mediando interazioni cellula-cellula. L'espressione di questi recettori è limitata alla linea ematopoietica e differisce nei vari tipi cellulari; in particolare SLAM è presente in linfociti T e B attivati, DC, monociti e piastrine [94-97]. SLAM è una proteina transmembrana di 70

kDa caratterizzata da un dominio extracellulare composto da due motivi Ig-simili che mediano le interazioni omotipiche, un singolo dominio transmembrana e una lunga regione citoplasmatica caratterizzata da tre motivi consensus denominati ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif - TxYxxV/I) contenenti residui di tirosina fosforilabili [94,98,99]. Studi iniziali sulla trasduzione del segnale di SLAM dimostrarono che la sua attivazione indotta da anticorpi agonisti induce proliferazione e produzione di INF γ [100] indipendente dal TCR. Studi in vivo su topi SLAM-difettivi non hanno osservato differenze nella produzione di INF γ bensì una ridotta secrezione di IL-4 [101]. Da questi esperimenti emerge comunque un modello che vede SLAM come molecola co-stimolatoria, il cui segnale modula la secrezione di citochine di tipo TH1 o TH2 [97,99]. SLAM partecipa alla sinapsi immunologica in quanto viene reclutato in prossimità del TCR e fosforilato dalle chinasi della famiglia di Src, Fyn e Lck nei domini ITSM (Tyr 281, 307 e 327) a seguito della stimolazione con anticorpi agonisti del solo TCR [98].

SAP ed EAT-2, che rappresentano gli interattori principali della famiglia dei recettori SLAM, condividono un meccanismo simile di riconoscimento e interazione con la propria sequenza consenso ma, mentre il legame di EAT-2 al recettore avviene solamente quando le tirosine sono fosforilate, SAP esibisce la peculiare capacità di associare a SLAM (CD150), ma non agli altri recettori della famiglia, anche in assenza di fosforilazione [98]. SAP è in grado di traslocare Fyn in membrana grazie all'interazione dell'Arg78, sita nel dominio SH2, ma sul lato opposto a quello di legame per la fosfotirosina, con il dominio SH3 di Fyn; in EAT2 questo sito è assente.

SAP può associarsi grazie al suo dominio SH2 a ognuno dei tre siti consensus presenti su SLAM e in particolare può legare i motivi contenenti le tirosine 307 e 327 se fosforilate e il motivo contenente la tirosina 281 anche in assenza di fosforilazione [98-102]. Inoltre, SAP è in grado di legare contemporaneamente la tirosina chinasi Fyn, che è richiesta per

l'attivazione di SLAM [103-105]. Nel linfocita quiescente è presente quindi un complesso stabile SLAM/SAP/FYN che in seguito alla stimolazione con anticorpi agonisti si modifica promuovendo la fosforilazione delle ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif) e il reclutamento di altri effettori come l'inositolo fosfatasi SHIP-1, gli adattatori Shc, Dok1 e Dok2 e scambiatori guaninici come RasGAP [94,99,106]. Questo complesso multiproteico promuove la produzione di citochine in associazione con il segnale generato dal TCR: infatti le vie di trasduzione del segnale utilizzate dai membri della famiglia di SLAM e dal TCR si sovrappongono e si rinforzano ampiamente per generare un'appropriata risposta immune.

Esistono alcune evidenze secondo le quali i recettori della famiglia SLAM potrebbero mediare la loro funzione anche in assenza di SAP: (i) nei macrofagi SAP non è espresso e la sua presunta funzione verrebbe ricoperta da EAT-2 che è però privo del dominio con cui SAP attiva Fyn; (ii) è stato osservato che il reclutamento di 2B4 attraverso anticorpi, in cellule NK di pazienti affetti da XLP, inibisce la citotossicità NK mediata; (iii) altri recettori della famiglia SLAM sono in grado di associare a proteine come SHP-2 e di mediare specifici segnali biochimici come l'attivazione di Akt anche in assenza di SAP [93].

L'importanza della segnalazione generata da SLAM e SAP nella regolazione della risposta immunitaria è emersa con l'identificazione di mutazioni di SAP in circa il 60% dei casi di XLP (X-linked lymphoproliferative disease) disordine immunologico ereditario, caratterizzato da una aumentata e disorganizzata risposta immune in seguito ad infezione fulminante da EBV (Epstein Barr Virus). In pazienti affetti da XLP il gene SAP presenta mutazioni che portano ad una completa perdita del gene o variazioni missenso che causano un arresto prematuro della sintesi proteica e/o una proteina non funzionale [107]. La malattia è quasi asintomatica in assenza di infezione da EBV, anche se a lungo termine diventano evidenti la linfoproliferazione, la disgammaglobulinemia e alcuni fenomeni autoimmuni [108]. Si pensa che questa sintomatologia corrisponda a una generale perdita di regolazione

della componente T-helper (in particolare sarebbe carente la risposta TH2 in favore della risposta TH1) della risposta immunitaria e che tale disordine diventi manifesto a seguito dell'infezione dei linfociti B con EBV con conseguente linfoproliferazione e danni sistemici spesso letali in età pediatrica [108,112].

Sebbene alcune caratteristiche della XLP possano essere ricondotte anche a deficit della citotossicità cellulo-mediata da parte di linfociti citotossici e NK, diversi studi in vivo e in vitro hanno fatto emergere sostanziali difetti dei linfociti T nella proliferazione e sintesi di interleuchine. I linfociti di pazienti XLP mostrano infatti un deficit di proliferazione, di sintesi di IL-2, di espressione di CD25 e di aggregazione omotipica in seguito a stimolazione combinata del TCR e del CD28 [109]. Inoltre i linfociti CD4⁺ da pazienti XLP esprimono meno ICOS e producono una quantità ridotta di IL-10, suggerendo che questi deficit siano la causa del mancato switch isotipico dei linfociti B e dell'ipogammaglobulinemia osservati negli stessi pazienti [110]. Sebbene i topi non siano suscettibili a infezione da EBV sono anche stati generati modelli murini SAP difettivi, simulando le condizioni che nell'uomo portano all'XLP. Questi topi sviluppano alterazioni funzionali del sistema immune quali assenza di plasmacellule mature a seguito di infezione virale, ridotta produzione di IgE, assenza dei centri germinativi, assenza di cellule memoria, esacerbata ed inefficace attivazione dei linfociti CD8⁺ in risposta alle infezioni croniche [111] che correlano con le osservazioni dirette sui loro linfociti stimolati in vitro, caratterizzati da deficit di secrezione di IL-4 e aumentata produzione di INF γ [112]. Sia Davidson e coll. [113] che Cannons e coll. [105] confermano questi dati ed evidenziano ulteriori difetti nei linfociti di topi SAP difettivi, quali ridotto reclutamento ed attivazione di PKC θ , ridotta fosforilazione di Bcl-10 e ridotta attività di NF-kB, suggerendo che i difetti nella produzione di citochine osservati siano almeno in parte dovuti ad una minore attività di questa via di segnalazione.

Mutazioni del gene di SAP sono state riscontrate anche in pazienti affetti da immunodeficienza comune variabile (CVID) e da linfocitocitosi emofagocitica (FLH) .

5.2 SAP e l'autoimmunità

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

L'aumentata espressione di SLAM in linfociti T provenienti da liquido sinoviale di pazienti affetti da artrite reumatoide può contribuire ad alterare il profilo citochinico incrementando la produzione di IL-10, IFN γ e TNF α , intervenendo,quindi,nel processo autoimmunitario [114].

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

Come descritto precedentemente, topi MRL-Fas^{lpr} presentano un quadro sovrapponibile all'ALPS. Studi genetici su un ceppo revertante insorto spontaneamente da una colonia di topi MRL-Fas^{lpr} e che presentava la malattia in forma frusta hanno dimostrato che questo ceppo era portatore di una mutazione del gene di SAP che causava la perdita di espressione di questa proteina [115]. Questi dati ci hanno suggerito un possibile ruolo di SAP come gene modificatore nell'ALPS.

SCOPO GENERALE DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è stato quello di ricercare e caratterizzare il coinvolgimento di geni importanti nella funzione dei linfociti T citotossici nello sviluppo o nel decorso delle malattie autoimmuni, focalizzando l'attenzione da un lato sul ruolo del gene di perforina in SM, dall'altro sul gene di SAP in ALPS. In particolare obiettivo del primo lavoro era estendere alla SM l'analisi del gene di perforina precedentemente analizzato su ALPS/DALD e T1DM. Obiettivo del secondo lavoro era analizzare il gene di SAP in ALPS/DALD in quanto da un lato questo gene è coinvolto nello sviluppo di una malattia linfoproliferativa con alcuni aspetti simili all'ALPS/DALD, dall'altro lato nei topi MRL-*lpr* un difetto di SAP è risultato protettivo per lo sviluppo del quadro ALPS tipico di questo modello animale.

SEZIONE 1

6 . PERFORINA E LA SCLEROSI MULTIPLA

Perforina è espressa costitutivamente negli astrociti, una volta attivati, in seguito all'innescio del processo infiammatorio. Gli astrociti esprimono anche il ligando di Fas (FasL) come meccanismo difensivo nei confronti di linfociti T autoreattivi che infiltrano il tessuto nervoso [116].

Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che gli oligodendrociti, deputati alla sintesi della mielina, sono suscettibili alla lisi osmotica indotta da perforina [117].

La demielinizzazione è stata inizialmente considerata come la causa primaria del deficit neurologico, alla base della SM. Diverse osservazioni hanno poi suggerito che non è sufficiente, da sola, a causare un deficit neurologico permanente. Il difetto neurologico associato alla demielinizzazione è il risultato della lesione assonale mediata dalle cellule effettrici, come i linfociti T citotossici. Inoltre Howe e coll. ipotizzano che il danno assonale secondario alla demielinizzazione è mediato da agenti infiammatori ed uno di questi è perforina [118]. D'altra parte i linfociti citotossici e perforina sono anche coinvolti nello spegnimento della risposta (auto)immunitaria e variazioni del gene di perforina (*PRF1*) sono stati associati allo sviluppo di ALPS/DALD e di T1DM. Poiché il ruolo che potrebbe svolgere perforina in SM è molto sfaccettato, questa prima parte della tesi è stata dedicata a valutare il coinvolgimento di variazioni di *PRF1* nello sviluppo ed evoluzione di questa malattia.

6.1 Materiali e Metodi

6.1.1 Pazienti

Nel nostro studio abbiamo analizzato il DNA genomico di due popolazioni indipendenti di pazienti con SM e controlli ottenute dall'Italia del Nord e Centro-Sud non imparentati tra loro. La prima popolazione (Nord Italia) era composta da 190 pazienti e 268 controlli, la seconda (Centro-Sud Italia) da 966 pazienti e 1520 controlli.

La diagnosi di SM è stata effettuata seguendo i criteri di McDonald e coll. [119].

I pazienti sono stati arruolati dal centro Sclerosi Multipla dell'Università del Piemonte Orientale di Novara, dall'ospedale policlinico IRCCS di Milano, dall'istituto "Don Gnocchi" (Milano), dall'ospedale Santa Croce di Cuneo, Dipartimento di Neurologia dell'Università La Sapienza di Roma e dal Dipartimento di Neurologia di Bari.

Tutti i pazienti e i controlli non erano imparentati tra loro ed erano caucasici italiani.

La fase clinica dello stato di malattia è stata valutato come segue [120]:

RR: forma caratterizzata da fasi di recidive con successive totali remissioni, con parziali e residui deficit post recidiva e mancanza di progressione tra le recidive (n= 852);

PP: forma caratterizzata da progressione a partire dall'esordio della malattia con occasionali fasi di plateau (n=92);

SP: forma caratterizzata da un esordio RR seguito da progressione con o senza recidive occasionali, remissioni minori e plateau (n=212).

Tutti i pazienti hanno fornito il loro consenso informato in accordo con la dichiarazione di Helsinki (International Committee of Medical Journal Editors, 1995) [121]. La ricerca è stata approvata dal comitato etico di Novara.

6.1.2 Ricerca di variazioni nel gene di perforina

Il DNA genomico è stato isolato attraverso separazione delle cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC: Perypheral Blood Mononuclear Cell), e gli esoni 2 e 3, codificanti perforina, sono stati amplificati con condizioni standard di PCR.

I prodotti di PCR, sono stati purificati dall'eccesso di primer e di nucleotidi non incorporati, utilizzando gli enzimi Exo I (1 unità) e SapI (5 unità).

Nella prima popolazione di pazienti e controlli, l'intera regione codificante è stata sequenziata con il kit specifico ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v1.1, su un sequenziatore automatico. La figura 1 mostra i primer usati per l'amplificazione e il sequenziamento.

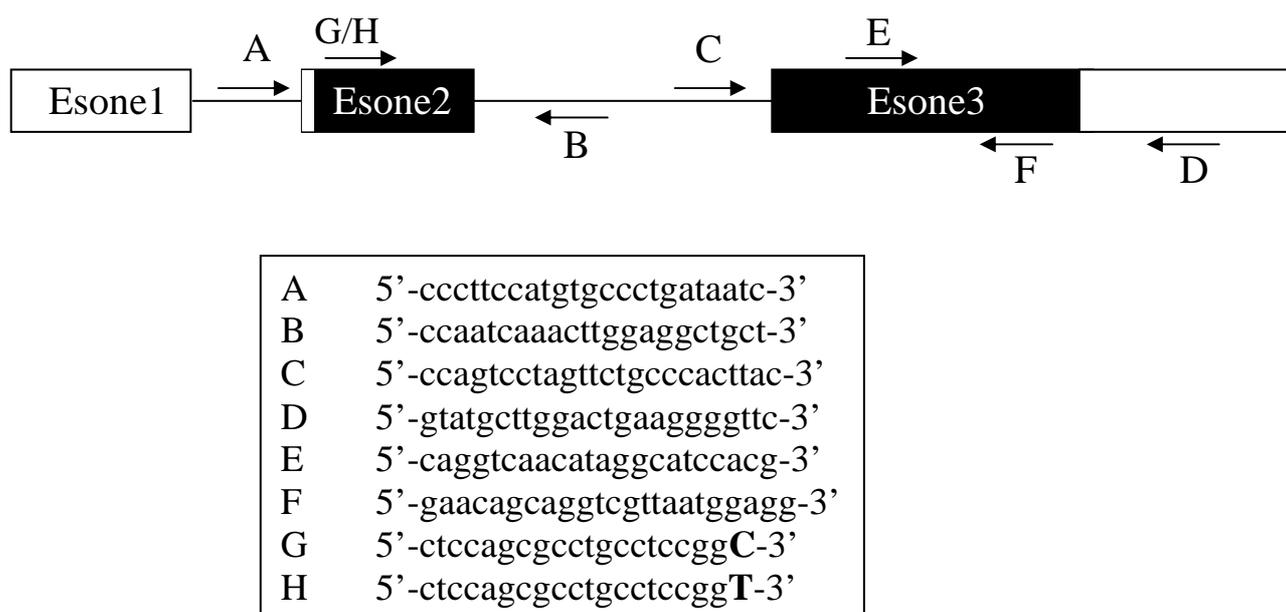


Figura 1: Rappresentazione grafica (non in scala) del gene PRF1, i primer usati per la tipizzazione e le variazioni trovate nei pazienti con SM. Il grafico superiore mostra uno schema del gene e la relativa posizione dei primer; le lettere e le frecce indicano i primer usati per l'amplificazione e il sequenziamento del gene e la relativa sequenza è mostrata nella tabella sottostante in basso a destra.

Nella seconda popolazione di pazienti e controlli, la genotipizzazione della variazione A91V è stata effettuata mediante l'utilizzo del saggio di discriminazione allelica TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). I primer allele-specifici e le relative sonde impiegate per la discriminazione dello SNP + 272 C/T (A91V) sono stati precedentemente riportati in letteratura [122]. Il genotipo di ciascun campione è stato determinato usando il software SDS 1,3 per discriminazione allelica. I pazienti e i controlli sono stati tutti tipizzati per l'allele DRB1*1501.

6.1.3 PCR allele-specifica

L'allele *wild type* (91A) e l'allele mutante (91V) sono stati amplificati separatamente mediante amplificazione per PCR del DNA genomico (*forward* 91A: G o H ; *reverse* : D). I prodotti di PCR, una volta purificati con il kit EXO/SAP, sono stati tipizzati per la variazione R357W e P355P mediante sequenziamento con specifico ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v1.1, usando un primer interno E.

6.1.4 Saggio di citotossicità

Il saggio di citotossicità è stato effettuato misurando il rilascio di ^{51}Cr da parte delle cellule bersaglio, ovvero la linea cellulare K562.

Le cellule bersaglio sono state trattate per 1 ora a 37°C con ^{51}Cr (30 μCi [1.11 MBq]/ 10^6 cellule) e lavate per tre volte con terreno di coltura prima dell'aggiunta delle cellule effettrici NK.

La lisi specifica è stata misurata in triplo, utilizzando 5×10^3 cellule K562 mescolate alle cellule effettrici in differenti rapporti (effettore/bersaglio 10:1, 30:1, 100:1) in un volume totale di 200 μl . La percentuale di lisi specifica è stata calcolata usando la seguente formula:

(Rilascio di ^{51}Cr nel campione - rilascio di ^{51}Cr spontaneo / Rilascio di ^{51}Cr totale - rilascio di ^{51}Cr spontaneo) x 100.

6.1.5 Analisi statistica

La frequenza genotipica è stata calcolata come il numero di individui portatori di un allele (ciascun omozigote o eterozigote) diviso il numero totale di individui.

L'analisi della frequenza allelica e genotipica è stata calcolata con il test del χ^2 . Tutti i valori delle p erano assunti dal test a due code (cut-off $P < 0.05$). Gli effetti delle variazioni sui presunti siti di splicing è stata valutata con il programma SpliceView (<http://www.itb.cnr.it/sun/webgene/>), mentre il significato funzionale delle variazioni missenso sono state valutate con il programma PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>).

6.2 Risultati

6.2.1 Ricerca di variazioni nucleotidiche nell'intera sequenza codificante di PRF1

L'intera porzione codificante di *PRF1* è stata sequenziata in 190 pazienti con SM e 268 controlli (Figura 1).

Abbiamo identificato quattro variazioni missenso: C272T (rs35947132), A755G (rs28933375), G719A e C1069T (numerazione relativa al cDNA clone M28393,+1 è la prima base del codone di inizio ATG). Tali variazioni determinano rispettivamente le seguenti sostituzioni aminoacidiche: A91V, N252S, R240H e R357W.

La N252S è una variazione rara, precedentemente associata all’FHL e alla sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS); mentre le variazioni R240H e R357W non sono riportate in letteratura.

Sono state identificate altre quattro variazioni sinonime: la variazione C999T, G1065A, G1428A e A1620G. Le suddette variazioni non influenzano i siti di splicing tranne la A1620G che potrebbe avere un effetto creando un nuovo sito accettore di splicing (Spliceview) e un nuovo sito di legame per proteine ricche degli aminoacidi Ser/Arg (ESEfinder).

Infine sono state identificate due variazioni nucleotidiche, C822T (rs885821) e T900C (rs885822) riportate in letteratura come polimorfismi non associati con FHL2; essi non cambiano l’aminoacido e non influenzano i siti di splicing. La loro frequenza è simile nei pazienti e nei controlli. Altre due variazioni sinonime (G435A e A462G) sono in perfetto linkage disequilibrium con N252S e sono state ritrovate solo in due soggetti (un paziente e un controllo).

A91V è stata trovata in 26 pazienti (23 eterozigoti, 3 omozigoti) e 23 controlli (eterozigoti); N252S in 1 paziente e 1 controllo (entrambi eterozigoti); R240H in 2 pazienti (eterozigoti); R357W, P333P, P355P e G476G in 1 paziente in omozigosi. I portatori delle variazioni R357W e P355P sono anche eterozigoti per A91V. La frequenza di tutte le variazioni già associate a FHL2 e le nuove variazioni è più alta nei pazienti rispetto ai controlli (frequenza allelica: 10% contro 4.5%, $p=0.0016$; frequenza genotipica: 17% contro 9%, $p=0.0166$; OR=2.06, IC: 1.13-3.77; Tabella 1).

Allele 1	Allele 2	SM* (n=190)†	Controlli (n=268)‡
A91V	A91V	3	0
A91V	R357W	1	0
A91V	P355P	1	0
Q540Q	Q540Q	1	0
A91V	wt	21	23
N252S	wt	1	1
R240H	wt	2	0
P333P	wt	1	0
G476G	wt	1	0
TOTALE		32 (17%)	24 (9%)

‡OR=2.06 (95%CI:1.13-3.77) p=0.0166

Tabella 1: Variazioni nucleotidiche del gene PRF1 identificate in 190 pazienti con SM e 268 controlli.

* pazienti con SM. †: numero di soggetti (frequenza tra parentesi); ‡: Odds ratio (OR) e intervallo di confidenza (95% CI).

L'algoritmo PolyPhen è stato utilizzato per predire l'effetto funzionale delle due nuove variazioni missenso R240H e R357W, dimostrando che entrambe possono danneggiare la funzione e la struttura della proteina (R240H score=2.355; R357W score=2.690).

Al fine di confermare se la variazione R240H potesse influire sulla funzione di perforina, si è andati a valutare l'attività NK in 2 pazienti portatori della variazione e 15 controlli allestendo un saggio di citotossicità mediante il test del rilascio di ⁵¹Cr. E' stata utilizzata la linea cellulare K562 come cellula bersaglio, in quanto sensibile alla citotossicità mediata dalle cellule NK. I risultati hanno mostrato che a basse dosi di effettore/bersaglio l'attività NK è risultata difettiva in un paziente e ai limiti della norma nell'altro (Figura 2).

Viceversa la conferma sperimentale dell'effetto di R375W sull'attività NK non è stata possibile poiché il soggetto portatore della mutazione non è stato reperibile per l'analisi.

E' degno di nota che entrambi i pazienti portatori della variazione R240H avevano presentato un viraggio precoce dalla forma RR alla forma SP di malattia, mentre questa evoluzione clinica non si era presentata nel paziente portatore della variazione R357W.

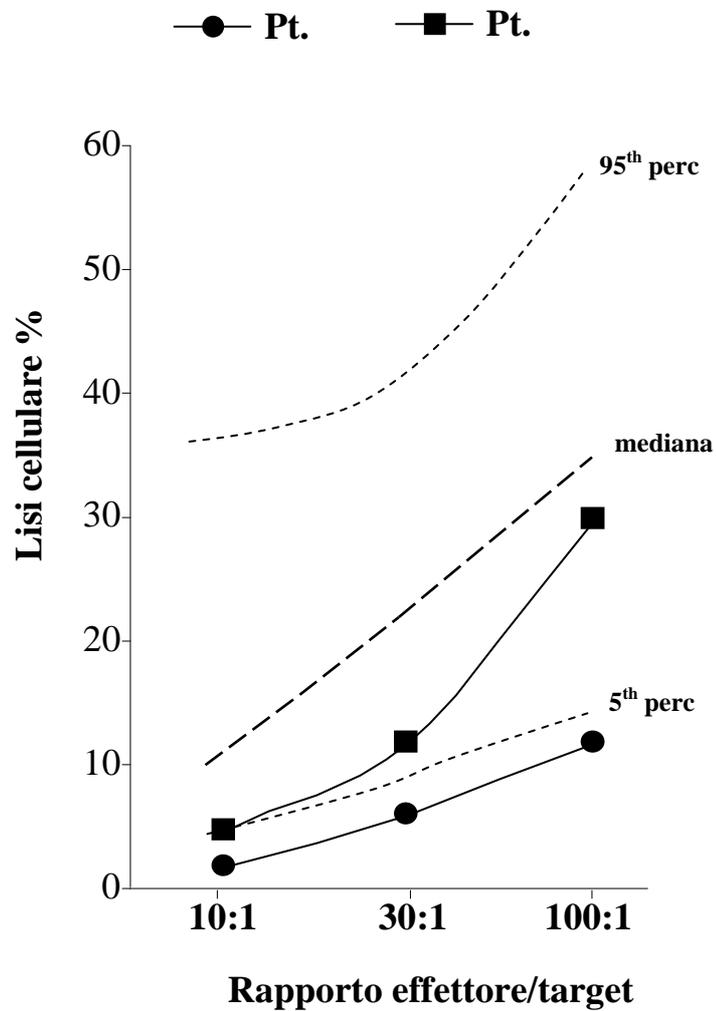


Figura 2:Attività NK in PBMC di pazienti con SM portatori della variazione R240H e controlli. La attività NK è stata valutata nel rapporto 100:1, 30:1, e 10:1 di target/effettore; le linee continue indicano i pazienti mentre quelle tratteggiate e puntinate indicano, rispettivamente, i valori della mediana e il 5-95 percentile di 15 controlli.

6.2.2 Ricerca della variazione nucleotidica A91V in una seconda popolazione di pazienti e controlli

Poiché la variazione nucleotidica A91V mostrava di per sé una associazione significativa con la SM nella prima popolazione di pazienti e controlli (frequenza dell'allele 91V: 7.6% contro 4.3 %, $p=0.044$), ci siamo proposti di valutare il coinvolgimento di questo singolo marcatore anche in una seconda popolazione indipendente di 966 pazienti e 1520 controlli. L'allele 91V è stato ritrovato in 138 pazienti (131 eterozigoti e 7 omozigoti) e 168 controlli (160 eterozigoti e 8 omozigoti) e la sua frequenza è risultata significativamente più alta nei pazienti rispetto ai controlli (7.5% contro 5.8%, $p=0.019$). Nella popolazione totale composta da 1156 pazienti e 1788 controlli, la presenza dell'allele 91V conferiva un Odds ratio di malattia di 1.38 (IC=1.10-1.74; Tabella 2).

Nessuna differenza è stata trovata tra soggetti di sesso differente in portatori o meno della variazione A91V, inoltre, non sono state riscontrate differenze nei soggetti portatori e/non della suddetta variazione in relazione alla forma clinica e/o decorso della malattia (RR, PP e SP).

	SM*	CONTROLLI
Genotipi	n=1156†	n=1788†
AA	992 (0.858)	1597 (0.893)
AV	154 (0.133)	183 (0.102)
VV	10 (0.009)	8 (0.005)
AV+VV vs AA	‡OR=1.38, 95% CI=1.10-1.74; $p=0.005$	

Tabella 2. Frequenza genotipica della variazione A91V nella popolazione totale di pazienti SM (n=1156) e controlli sani (n=1788).

*pazienti SM. †:numero di soggetti; la frequenze sono mostrate tra parentesi. La distribuzione genotipica non devia significativamente dall'equilibrio di HardyWeinberg (dati non mostrati) ‡: Odds ratio (OR) e intervallo di confidenza (95% CI).

6.3 *Discussione*

La SM è una malattia infiammatoria e demielinizzante del sistema nervoso centrale, mediata da una risposta autoimmune dei linfociti T helper proinfiammatori (TH1) e dei linfociti T citotossici contro antigeni della guaina mielinica.

L'evento scatenante la malattia non è noto, ma studi epidemiologici suggeriscono che è probabilmente innescata da fattori ambientali, quali le infezioni virali, ed è inoltre favorita da un "background" genetico predisponente.

Diversi geni sono coinvolti nella suscettibilità alla malattia ed alcuni di questi (IL-1beta antagonista, IL-1R e osteopontina) svolgono un ruolo importante nella risposta immunitaria [123].

Il lavoro descritto in questa tesi dimostra il coinvolgimento del gene di perforina (*PRFI*) nella suscettibilità allo sviluppo della SM. Questo conferma una serie di altri dati presenti in letteratura che dimostrano come la regione 10q22.1, dove è localizzato il gene *PRFI*, conterrebbe geni di suscettibilità per lo sviluppo della SM.

Perforina è una proteina presente nei granuli dei CTL e delle cellule NK ed è coinvolta nella citotossicità cellulo-mediata. Mutazioni bialleliche di *PRFI* causano la linfoistiocitosi emofagocitica familiare, una rara immunodeficienza congenita. Recentemente è stato descritto che variazioni monoalleliche di *PRFI* (A91V e N252S) possono agire da fattori predisponenti per lo sviluppo della ALPS, una rara malattia autoimmune ereditaria causata da alterazioni dell'apoptosi linfocitaria. [91].

La variazione A91V è risultata essere più frequente nelle due popolazioni di pazienti SM analizzate rispetto ai corrispettivi controlli, incrementando il rischio di sviluppare la malattia di 1.3 volte nella prima popolazione e di 1.5 volte nella seconda. Il fattore di rischio (OR) calcolato nella popolazione complessiva di 1156 pazienti e 1788 controlli è risultato essere di 1.38 (95%CI= 1.10-1.74). Questi dati sono in accordo con quelli descritti precedentemente

nella ALPS dove la variazione A91V incrementava il rischio di malattia di circa tre volte [91]. Invece, non abbiamo riscontrato alcuna associazione significativa con la variazione N252S, in precedenza associata alla ALPS.

In passato vari lavori hanno dimostrato che l'A91V è associata a svariate malattie del sistema immunitario, come ad esempio linfomi non Hodgkin, leucemia anaplastica a grandi cellule e FHL [124-125]. Inoltre vari lavori hanno dimostrato che questa variazione riduce l'attività funzionale di perforina alterando la sua conformazione, diminuendo la sua attivazione proteolitica e accelerandone la degradazione [126].

In effetti Risma e coll. hanno classificato l'A91V come mutazione missenso di classe I, con un limitato impatto funzionale, che determina una parziale maturazione della proteina [127]. Voskoboinik e coll. hanno recentemente dimostrato che tale variazione riduce i livelli di espressione di perforina nelle cellule effettrici ("difetto pre-sinaptico") e la sua capacità litica sulle cellule bersaglio, mostrando inoltre un effetto dominante negativo sulla proteina *wild type* ("difetto post-sinaptico") [128].

Viceversa il significato funzionale della N252S è stato molto dibattuto, anche se un paio di lavori precedenti dimostrano che potrebbe essere associata con un decremento della attività NK nella prima infanzia [121,92].

Oltre alla A91V e alla N252S, sono state identificate due nuove mutazioni missenso nei pazienti con SM che determinano le sostituzioni aminoacidiche R240H e R357W. Tali variazioni cadono nello stesso dominio della N252S in una regione di perforina detta MAC (Membrane-Attack Complex), che sembra essere critica per la formazione di pori nella membrana della cellula bersaglio [129]. L'analisi della attività delle cellule NK e dell'espressione di perforina nei due soggetti portatori della R240H non ha però dimostrato un importante effetto funzionale. Dal momento che nei due pazienti la mutazione identificata era in eterozigosi, è ipotizzabile che l'R240H determini un leggero effetto sulla funzione di

perforina senza esercitare un effetto dominante negativo sulla forma *wild-type*. Questo sarebbe in accordo con quanto già descritto della mutazione N252S. Non è stato invece possibile valutare una eventuale correlazione tra la variazione R375W e l'attività NK, poiché il campione non era disponibile per l'analisi.

Infine è degno di nota che il paziente con la mutazione R357W era anche portatore in eterozigosi composta della variazione A91V; è pertanto possibile che le 2 due variazioni, situate su due alleli differenti possano aver entrambe contribuito allo sviluppo della sua malattia.

Abbiamo identificato in altri pazienti SM quattro nuove variazioni che non determinano un cambiamento aminoacidico (P333P, P355P, G476G e Q540Q). Inoltre esse non alterano i siti di splicing, tranne la Q540Q che potrebbe creare un nuovo sito accettare di splicing. Pertanto il loro ruolo nello sviluppo della malattia potrebbe essere indiretto attraverso *linkage disequilibrium* con altre variazioni presenti nella regione 5'UTR. Tuttavia non si può nemmeno escludere un loro ruolo diretto in quanto è stato dimostrato che anche mutazioni sinonime possono modificare l'espressione della proteina influenzando il trasporto e il processamento dell'mRNA o interagendo con microRNA [130,131]. Comunque, non abbiamo potuto testare un loro effetto sull'espressione di perforina, perché non è stato possibile recuperare i corrispettivi campioni su cui effettuare tale analisi.

Le nuove mutazioni da noi identificate sono rare e non è pertanto possibile concludere che vi sia una loro individuale associazione alla malattia. Comunque, la loro presenza solo nei pazienti suggerisce che vi sia un effetto globale sulla suscettibilità a sviluppare la malattia, maggiore rispetto quello dovuto alla sola A91V, ed in effetti nel loro insieme queste variazioni aumentano di circa due volte il rischio di sviluppare SM (O.R=2.06 95%CI:1.13-3.37).

E' interessante notare come il rischio determinato da variazioni di *PRF1* potesse essere particolarmente marcato in tre pazienti portatori di variazioni bialleliche: 2 pazienti eterozigoti composti per A91V e R357W o P355P, rispettivamente, e un terzo paziente omozigote per Q540Q.

La citossicità perforina-mediata è coinvolta nella eliminazione delle cellule infettate da virus. È ipotizzabile che difetti della attività di perforina possano favorire lo sviluppo della SM riducendo l'efficienza della eliminazione virale e aumentando di conseguenza il rischio di sviluppo di reazioni crociate tra antigeni virali e antigeni *self* (meccanismo di mimetismo molecolare). In questo contesto è degno di nota che le infezioni da virus EBV (Epstein Barr virus) hanno un ruolo chiave nello sviluppo della FHL ed è stato anche suggerito che possano rivestire un ruolo chiave come fattori scatenanti per la SM [132].

Diverse evidenze mostrano che perforina e la citotossicità cellulo-mediata sono anche coinvolti nello spegnimento della risposta immunitaria. I linfociti CTL e le cellule NK possono anche funzionare da regolatori negativi ed attraverso perforina possono indurre la morte cellulare dei linfociti effettori e delle cellule presentanti l'antigene (APC). Tali evidenze suggeriscono che difetti funzionali di perforina potrebbero predisporre alla SM anche riducendo l'efficienza di questo sistema di immunoregolazione.

In effetti è da tenere in considerazione che difetti ereditari dello spegnimento della risposta immunitaria coinvolti nello sviluppo di SM non si limiterebbero a difetti di perforina, ma includerebbero anche difetti ereditari della funzionalità di Fas, un altro meccanismo implicato nello spegnimento della risposta immunitaria e spesso difettoso dei pazienti con SM [133]. Inoltre i pazienti con SM presentano elevati livelli della citochina osteopontina, in parte legati a varianti del suo gene, la quale è capace di inibire la AICD (activation induced cell death) a sua volta coinvolta nello spegnimento della risposta immunitaria [134,135].

In conclusione, questo lavoro dimostra come variazioni di *PRF1* possano essere fattori predisponenti per lo sviluppo della SM e suggeriscono che questo effetto possa essere legato a un difetto funzionale della risposta antivirale oppure dello spegnimento della risposta immunitaria. Difetti di entrambe queste funzioni possono favorire lo sviluppo di autoimmunità attraverso il prolungamento della risposta immunitaria e incrementando il rischio di cross-reazioni tra antigeni *self* e antigeni virali.

SEZIONE 2

7. SAP E L'ALPS.

SAP è un adattatore molecolare coinvolto nella trasduzione del segnale e nell'attivazione dei linfociti; esso regola la funzione di alcuni recettori appartenenti alla famiglia di SLAM i quali sono implicati in processi come la regolazione della citotossicità delle cellule NK o nello switch isotipico [136,137]. Mutazioni a carico di *SAP* sono una causa della sindrome di Duncan (XLP: X-linked lymphoproliferative disease), disordine immunologico ereditario, caratterizzato da una ridotta capacità di controllare le infezioni da EBV (Epstein Barr Virus) [138].

Sebbene non sia stato ancora del tutto chiarito il ruolo di questa molecola nell'autoimmunità è stato osservato come in colonie di topi *MRL^{lpr/lpr}*, mutazioni spontanee del gene di *SAP* che causano una perdita di espressione della proteina determinano una parziale protezione dallo sviluppo della malattia autoimmune linfoproliferativa tipica del carattere *lpr*, il che suggerisce una relazione opposta tra i difetti di Fas e quelli di *SAP*.

Scopo di questo lavoro era analizzare il gene di *SAP* (SH2D1A) in pazienti affetti da ALPS per valutare se anche nell'uomo questo gene possa influenzare lo sviluppo della malattia. Infatti causa primaria dell'ALPS sono alterazioni genetiche che riducono l'efficienza della trasduzione del segnale da parte del recettore di morte Fas, ma lo sviluppo della malattia è anche influenzato da geni "modificatori" che possono condizionare l'effettiva penetranza del difetto a carico di Fas.

7.1 Materiali e metodi

7.1.1 Pazienti

Nel nostro studio abbiamo analizzato 16 pazienti con ALPS (10 maschi e 6 femmine) e 25 pazienti con DALD (17 maschi e 8 femmine) e 535 controlli sani, etnicamente correlati, provenienti dal Dipartimento di Pediatria dell'Università di Torino e dal Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università del Piemonte Orientale. I prelievi di sangue periferico sono stati ottenuti da pazienti e controlli sotto consenso informato. Lo studio è stato effettuato secondo le linee guida del comitato etico locale.

La diagnosi di ALPS si basava sulla presenza dei seguenti quattro criteri: 1) citopenia autoimmune che coinvolge una o più linee di cellule ematiche, 2) linfadenopatia cronica non maligna (aumento di almeno 2 cm del diametro di due o più linfonodi) e/o splenomegalia, 3) difetto di apoptosi linfocitaria indotta da Fas *in vitro*, e 4) mutazioni nei geni di Fas, FasL, caspasi10 e/o espansione nel sangue periferico (>2%) di linfociti T TCR $\alpha\beta$ positivi doppi negativi (DN) per CD4 e CD8. La diagnosi di DALD si basava sulla presenza dei primi 3 criteri e sull'assenza del quarto.

7.1.2 Ricerca di variazioni in SH2D1A

La regione del DNA corrispondente al promotore, ai quattro esoni e al 3'UTR del gene SH2D1A è stata amplificata mediante PCR e sottoposta ad analisi tramite sequenziamento diretto per cercare mutazioni e polimorfismi noti e non noti.

Le reazioni di PCR e di sequenza sono state condotte secondo le procedure standard e i prodotti sono stati analizzati con il kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v1.1, tramite un sequenziatore automatico.

7.1.3 Screening funzionale

Per valutare i livelli trascrizionali di *SAP*, i PBMC, ottenuti mediante separazione di cellule mononucleate da sangue periferico, sono stati attivati con PHA (1 µg/ml) al giorno 1 e coltivate in terreno RPMI 1640 completato con 10% di siero fetale bovino (FBS) e interleuchina-2 (IL-2) (10U/ml) per dodici giorni.

7.1.4 Real Time PCR

L'RNA messaggero è stato estratto da PBMC derivati da soggetti di controllo, maschi, emizigoti per la variazione dopo dodici giorni di coltura, come descritto in precedenza, utilizzando il kit NucleoSpin RNAII. 500 ng di mRNA totale sono stati poi retrotrascritti utilizzando il kit ThermoscriptTM RT-PCR System. L'espressione di *SAP* è stata valutata con un saggio di espressione genica Assay on Demand (Applied Biosystem (Assay No. Hs99999139_m1 e Assay No. Hs001677093_m1 rispettivamente). Il gene *housekeeping* GAPDH (Assay No.Hs99999905_m1) è stato utilizzato per normalizzare le variazioni del cDNA. La reazione di Real Time è stata condotta nello strumento 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem), e i dati ottenuti sono stati analizzati con il metodo delle curve standard.

7.1.5 Analisi della metilazione

I campioni di DNA genomico sono stati trattati con bisolfito di sodio utilizzando il kit EZ DNA Methylation-Gold kit-Zymo Research. In breve, il DNA (500 ng) è stato unito con 130 µl di reagente di conversione, la mix è stata posta in un termociclatore a 98°C per 10 min, 64°C per 2.5 ore e mantenuta a 4°C per 1 ora. In seguito sono stati aggiunti alla mix 600 µl di M-Binding Buffer e trasferiti in una colonna Zymo-Spin IC e centrifugati per 30 secondi a 10.000 x g. La colonna è stata lavata con 100 µl di M-Wash buffer (contenente etanolo) e

incubata con 200 µl di M-Desulphonation Buffer a temperatura ambiente per 20 min. Le colonne sono state quindi centrifugate per 30 secondi alla massima velocità e lo scarto è stato eliminato; successivamente sono state lavate due volte con M-Wash Buffer e il DNA purificato è stato eluito in 10 µl di M-Elution Buffer. La regione che contiene lo SNP di interesse è stata quindi amplificata usando dei primers specifici (Tabella 3), uno dei quali biotinilato. L'amplicone è stato sequenziato usando un Pyrosequencer PyroMark ID (Biotage AB and Biosystems, Uppsala, Sweden); la singola elica di DNA è stata isolata dalla reazione di PCR usando il Pyrosequencing Vacuum Prep Workstation (Biotage AB) e biglie di sepharose (Sephacrose TM High Performance beads (Amersham Biosciences)) che legano il primer biotinilato. Dopo il lavaggio con etanolo 70% e un'incubazione con un tampone di denaturazione, le biglie sono state lavate e distribuite in una piastra da 96 pozzetti contenente lo specifico primer per sequenza. La piastra è stata mantenuta a 80°C per 2 minuti e successivamente raffreddata a temperatura ambiente. Lo SNP bersaglio è stato valutato convertendo il pirogramma in un valore numerico in relazione all'altezza del picco.

PRIMER	SEQUENZA
SAP-F	GGTGGTTTTTGAGTAAAT
SAP-R-byo	CCAACACAAAATTCATACA
SAP-seq	GAAGTATTATTAAGTATTTT

Tabella 3: Primer usati per l'amplificazione e il sequenziamento delle regione contenente lo SNP da analizzare con la tecnica del bisolfito.

7.1.6 Analisi statistica

L'analisi della distribuzione dei polimorfismi, degli aplotipi e dei genotipo nelle popolazioni è stata fatta con il test del χ^2 o col test di Fisher. Per l'analisi degli aplotipi è stato utilizzato il software Haploview. I risultati dei test funzionali sono stati analizzati con il test non

parametrico di Mann-Whitney. Le analisi statistiche sono state effettuate impiegando il software GraphPad InStat (San Diego, California, USA). Tutti i valori di p sono stati assunti con test a due code (cut-off $P < 0.05$).

7.2 Risultati

7.2.1 Ricerca di variazioni nel gene di SAP in pazienti con ALPS/DALD

La regione del DNA corrispondente al promotore, ai quattro esoni e al 3'UTR del gene SH2D1A è stata sequenziata nel DNA genomico di 41 pazienti con ALPS ($n^{\circ}=16$) o DALD ($n^{\circ}=25$) e 535 controlli.

I risultati del sequenziamento non hanno evidenziato nessuna mutazione nei pazienti e nei controlli, ma hanno evidenziato tre polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nella regione del promotore, -631 G/A; -494 G/A; -346 C/T, già descritti nelle banche dati (<http://snpper.chip.org>).

L'analisi della distribuzione allelica di questi SNP nei pazienti e nei controlli ha dimostrato che gli alleli -631A e -346T (-631A: 57% vs 38%; -346T: 57% vs 37%) sono più frequenti nei pazienti rispetto ai controlli, con una significatività statistica che regge la correzione di Bonferroni per il numero di SNP testati (Tabella 4).

<i>Variazioni</i>	<i>Soggetti</i>	<i>Alleli</i>		
		A	G	
Rs990545	Controlli N=535 [†]	401 (38%)	669 (63%)	P=0.0006[§] OR=2.24 (1.39-3.62)
	Pazienti N=41 [†]	47 (57%)	35 (43%)	
Rs7357894	Controlli N=535 [†]	455 (42%)	615 (58%)	NS
	Pazienti N=41 [†]	23 (28%)	49 (72%)	
Rs12164382	Controlli N=535 [†]	676 (63%)	394 (37%)	P=0.00036[§] OR=2.30 (1.43-3.72)
	Pazienti N=41 [†]	35 (43%)	47 (57%)	

Tabella 4: Frequenza allelica delle variazioni studiate nel promotore del gene SAP in 41 pazienti ALPS e 535 controlli.

†: numero di soggetti (frequenza tra parentesi); § valore di P non corretto per il numero di comparazioni

Questi dati indicano che la presenza dell'allele -631A aumenta di circa 2 volte il rischio di sviluppare la malattia (OR=2.24; 95% IC: 1.39-3.62), e un simile effetto è esercitato dall'allele -346T (OR=2.30; 95% IC: 1.43-3.72).

Il programma Haploview ha rilevato un elevato *linkage disequilibrium* tra i 3 SNP, con valori massimali tra gli SNP -346 e -631 (Figura 3).

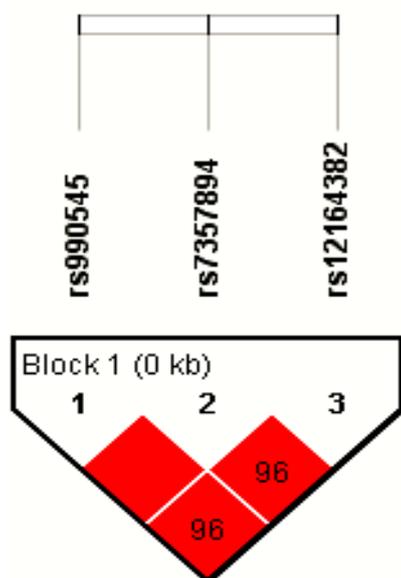


Figura 3: Linkage disequilibrium tra gli SNPs del promotore del gene *SAP*. Il valore di D' (Lewontin D value) è riportato nel triangolo. Il colore rosso indica livelli significativi di LD (i valori di D' sono espressi in percentuale). Valori di LD uguali a 1 non vengono riportati nel triangolo.

Un'analisi *in silico* col programma "Transcription Element Search System analysis" ha evidenziato che nessuno dei 3 SNP modifica siti di legame per fattori trascrizionali, ma dati in letteratura indicano la posizione -346C come un potenziale sito di metilazione, che verrebbe perso nell'allele -346T. Questi dati ci hanno quindi indotto a concentrare l'attenzione sullo SNP -346 C/T, che era anche quello maggiormente associato al ALPS/DALD.

Poiché SH2D1A è localizzato sul cromosoma X, una prima analisi ha valutato l'effetto di questa variazione sullo sviluppo di ALPD/DALD suddividendo la popolazione per sesso. L'analisi della distribuzione allelica e genotipica ha evidenziato che i maschi portatori dell'allele -346T sono significativamente più frequenti nei pazienti rispetto ai controlli (67% vs 36%; $p=0.0035$) e che questo allele aumenta di oltre 3 volte il rischio di sviluppare la

malattia nella popolazione maschile (OR=3.50; 95% IC: 1.44-8.68). Viceversa nelle femmine le frequenze alleliche e genotipiche sono simili nei pazienti e nei controlli (Tabella 5).

<i>Variatione</i>	<i>Soggetti</i>	<i>Genotipo Maschi†</i>			<i>Genotipo Femmine†</i>			
		<i>C</i>	<i>T</i>		<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	
<i>-346C/T</i>	Controlli N=535	236 (64%)	135 (36%)	<i>P=0.0035[§]</i> <i>OR: 3.50</i> <i>(1.44-8.68)</i>	66 (40%)	72 (44%)	26 (16%)	<i>NS</i>
	Pazienti N=41	9 (33%)	18 (67%)		6 (43%)	6 (43%)	2 (14%)	

Tabella 5: Distribuzione della frequenza allelica e genotipica dello SNP -346C/T in pazienti ALPS/DALD e controlli suddivisi per sesso.

†: numero di soggetti (frequenza tra parentesi); § valore di P non corretto per il numero di comparazioni

Una seconda analisi ha valutato se l'associazione dello SNP -346C/T fosse significativa sia nell'ALPS che nella DALD, dividendo i pazienti secondo la loro diagnosi, e ha esteso lo studio a pazienti con una diversa malattia autoimmune, la sclerosi multipla (n=386) (SM). I risultati dimostrano che l'allele -346T è significativamente più frequente rispetto ai controlli (37%) sia nei pazienti con ALPS (56%; p=0.04) che in quelli con DALD (58%; p=0.004); inoltre in entrambe le popolazioni questo dato è prevalentemente attribuibile alla popolazione maschile, in quanto i maschi emizigoti per -346T sono più frequenti rispetto ai controlli (36%) sia nel gruppo ALPS (79%; p=0.035) che in quello DALD (65%; p=0.01). Viceversa -346T non presentava nessuna associazione con la SM, in quanto le frequenze

alleliche e genotipiche in questi pazienti erano sovrapponibile a quelle dei controlli (Tabella 6).

Soggetti	Alleli ^a		p ^c	Genotipo femmine ^b			Genotipo maschi ^b		p ^c
	C	T		CC	CT	TT	C	T	
Controlli N=535	676 (63%)	394 (37%)	NS	66 (40%)	72 (44%)	26 (16%)	236 (64%)	135 (36%)	NS
Sclerosi Multipla N=386	452 (58%)	320 (42%)	NS	61 (39%)	68 (43%)	28 (18%)	131 (57%)	98 (43%)	NS

Tabella 6: Frequenze alleliche e genotipiche della variazione -346 C/T in pazienti SM (n°=386) e controlli (n°=535).

a: numero di cromosomi, le frequenze sono rappresentate tra parentesi;

b: numero di soggetti. La distribuzione genotipica non devia significativamente dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (dati non mostrati);

c: χ^2 test calcolato sulle frequenze alleliche e genotipiche

7.2.2 Analisi funzionale di -346C/T

L'osservazione che l'allele -346C sia un possibile sito di metilazione è particolarmente interessante alla luce di lavori che indicano che in diverse linee cellulari il livello di metilazione di SH2D1A correla con i livello di espressione di SAP.

Per valutare l'effettivo coinvolgimento dell'allele -346C nella metilazione di SH2D1A, abbiamo valutato lo stato di metilazione di questo sito in linfociti attivati in vitro di 5 soggetti sani di controllo portatori di -346C: tre maschi emizigoti e due femmine omozigoti.

I risultati dimostrano che -346C è effettivamente metilato (30% nelle condizioni sperimentali esaminate) e questo suggerisce un suo coinvolgimento nella regolazione dell'espressione di *SAP* (Figura 4).

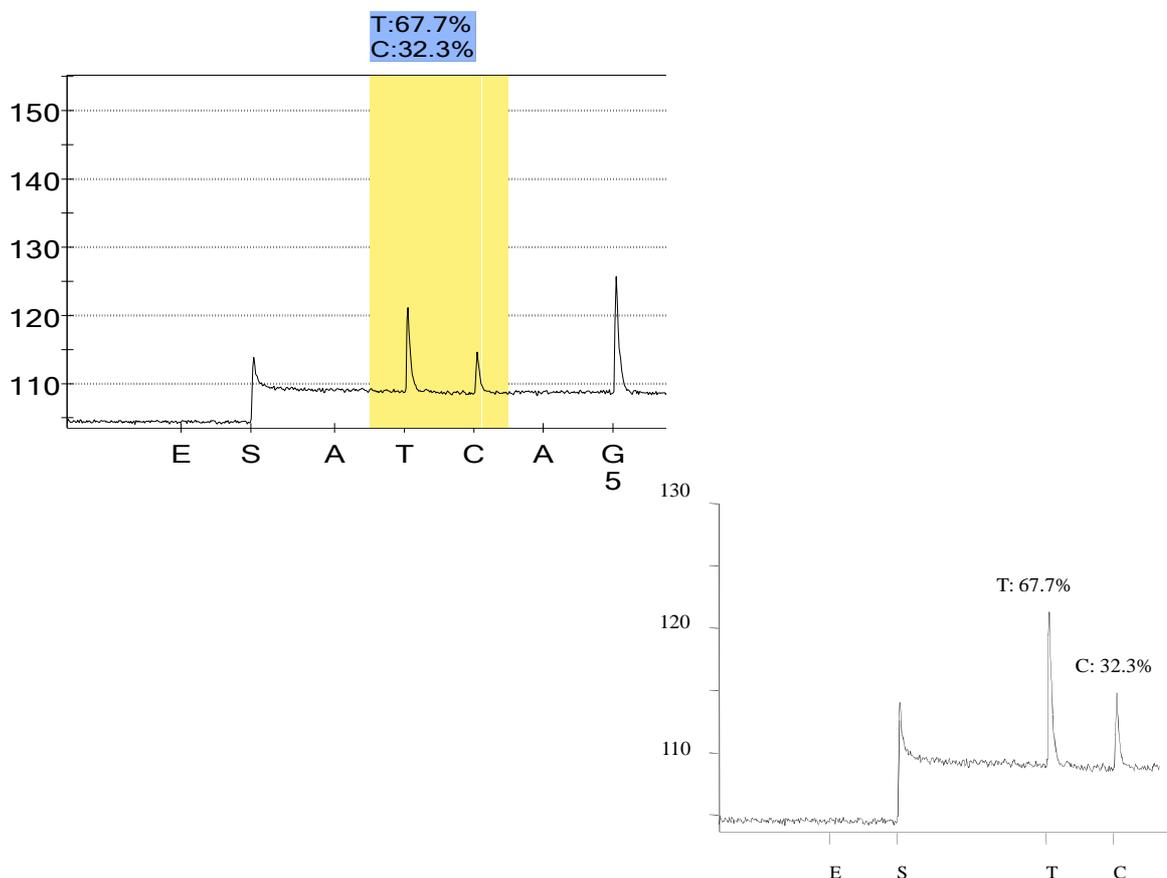


Figura 4: Analisi della metilazione in PBMC attivati derivati da soggetti sani portatori della variante -346C Analisi quantitativa della metilazione di campioni di DNA. E' rappresentato un pirogramma dei cinque esperimenti, con i livelli di metilazione dell'allele -346C.

Al fine di analizzare se il polimorfismo -346C/T influenza effettivamente l'espressione di *SAP*, abbiamo analizzato la produzione di RNA messaggero in linfociti attivati in vitro, derivati da sangue periferico di maschi sani (n°=4) portatori dell'una o dell'altra variante. L'analisi è stata effettuata su linfociti attivati con PHA e tenuti in coltura per 12 giorni in

presenza di IL-2, in quanto esperimenti preliminari avevano dimostrato una elevata espressione di *SAP* in queste condizioni sperimentali. L'analisi dell'espressione del mRNA di *SAP* con la tecnica della Real-Time PCR ha dimostrato che i portatori della variante -346T (non metilabile) producono più alti livelli di mRNA rispetto ai portatori della variante -346C (metilabile) ($p < 0.0001$), il che supporta la possibilità che la metilazione dell'allele -346C possa ridurre l'espressione di *SAP* (Figura 5).

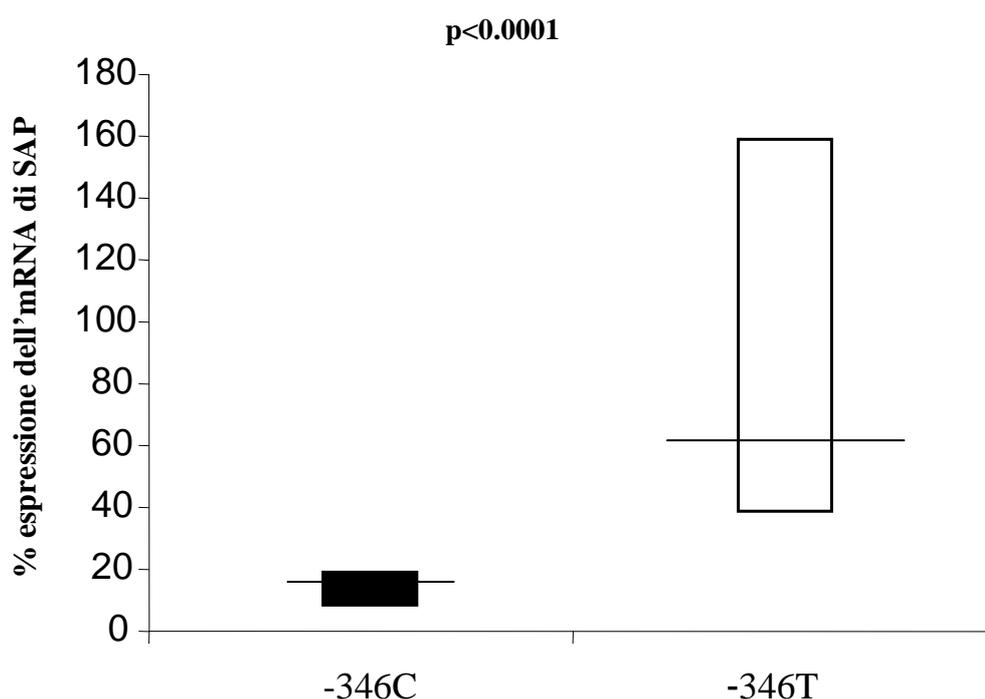


Figura5. Espressione dell'RNA messaggero codificante per SAP in maschi emizigoti per -346C o -346T. I valori sono stati normalizzati a quelli del gene della GAPDH. Il valore della p è stato calcolato utilizzando il test statistico di Mann-Whitney. I risultati sono espressi in percentuale dei valori CT calcolati dallo strumento, rapportati fra loro ponendo a 100% la media dei valori dei soggetti portatori della variante -346T.

7.3 *Discussione*

Questo lavoro dimostra che la variazione -346C/T del gene di *SAP* è associata ad ALPS e DALD e suggerisce che questo effetto sia legato alla metilazione di questo sito e a un corrispondente effetto sull'espressione di *SAP*. In particolare i pazienti affetti da ALPS e DALD mostrano un'aumentata frequenza dell'allele -346T, il quale non è metilabile ed è associato a una maggiore espressione di *SAP* rispetto alla variante metilabile -346C. Questi risultati confermano quanto è stato dimostrato nel topo MRL *lpr/lpr* dove una inserzione spontanea di una A nel primo esone del gene di *SAP*, responsabile di una difettiva espressione di *SAP*, è risultata ridurre la gravità della malattia autoimmune/linfoproliferativa sviluppata da questo ceppo murino, con riduzione della ipergammaglobulinemia, della produzione di autoanticorpi, della linfadenopatia, della splenomegalia, della glomerulonefrite e di vari altri segni clinici di malattia [139].

Nove SNPs sono stati descritti nel gene umano di *SAP*: uno nell'esone 1, uno nell'esone 2, quattro nel 3'UTR e tre nella regione del promotore, ma solo gli ultimi tre sono stati ritrovati nella nostra popolazione di pazienti e controlli. Questi tre SNP presentano un forte *linkage disequilibrium* e, in particolare, i polimorfismi -346C/T e -631A/G, risultati significativamente associati con ALPS/DALD, presentavano un *linkage disequilibrium* quasi assoluto ($D' 0.96$, $r^2 0.8$).

L'associazione più forte con l'ALPS/DALD è stata mostrata dalla variazione -346C/T, la cui variante -346C potrebbe essere un potenziale sito di metilazione, trovandosi in un sito ricco di isole CpG, come proposto dalla letteratura e comprovato da una nostra analisi in silico [140].

Il nostro lavoro ha confermato sperimentalmente la metilazione di questo sito e ha evidenziato che i portatori dell'allele -346C esprimono livelli più bassi di *SAP* rispetto a portatori dell'allele -346T.

Un aspetto peculiare dei nostri dati è l'apparente selettività dell'effetto di -346C/T, la cui associazione con ALPS/DALD sembra riguardare prevalentemente i soggetti maschi. Questo risultato potrebbe essere casuale, legato al piccolo numero di pazienti femmine incluse nello studio, la cui analisi statistica è resa ancora più problematica dalla presenza dei soggetti eterozigoti, assenti tra i maschi (il gene *SAP* è localizzato sul cromosoma X). Tuttavia non si può escludere che il dato identifichi effettive differenze nella malattia sviluppata dai due sessi. Questa possibilità sarebbe in linea con un'osservazione di Rosai e coll. i quali hanno dimostrato che i linfonodi di maschi con ALPS presentano frequentemente alcuni aspetti istologici tipici della sindrome di Rosai-Dorfman, quali una proliferazione non neoplastica di cellule istiocitiche/fagocitiche all'interno dei seni linfonodali, che sono invece rari nelle pazienti femmine [141].

SAP comprende due domini funzionali per l'interazione proteica; il primo è un dominio SH2, mentre il secondo è costituito da una corta coda di 28 aminoacidi all'estremità C-terminale che presenta due tirosine fosforilabili. *SAP* può associarsi, grazie al suo dominio SH2, ad ognuno dei tre siti di consenso presenti sul recettore SLAM e in particolare può legare i motivi contenenti le tirosine 307 e 327, se fosforilate, e il motivo contenente la tirosina 281 anche in assenza di fosforilazione [142-146]. Inoltre *SAP* è in grado di legare contemporaneamente la tirosina chinasi Fyn, che è richiesta per l'attivazione di SLAM [104-106]. Queste vie di segnalazione sembrano essere importanti per lo sviluppo del quadro autoimmune/linfoproliferativo nel topo *MRL^{lpr/lpr}*, dove elevati livelli di attivazione di Fyn nei linfociti T suggeriscono un ruolo di questa chinasi nella anormale sopravvivenza di queste cellule [147]. In linea con questa possibilità, l'introduzione di un deficit di Fyn in questi animali comporta una marcata riduzione della linfadenopatia e della produzione di autoanticorpi, il che ricorda l'effetto prodotto in questi animali dal deficit di *SAP*.

La famiglia SLAM è costituita da un gruppo di sette recettori transmembrana appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline: SLAM (CD150), 2B4 (CD244), CD84, CD48, NTBA (SLAMF6 or Ly108 in the mouse), Ly9 (CD229,) e CRACC (CD319) che mappano tutte sul cromosoma 1[148,149]. La maggior parte dei membri di questa famiglia (fra cui SLAM, NTB-A e CRACC) mediano interazioni omotipiche, mentre 2B4 lega CD48, la cui espressione è incrementata dalla infezione da EBV; il difetto di risposta all'infezione da EBV tipica dei pazienti con XLP è probabilmente dovuta al difetto della citotossicità mediata da 2B4. In effetti il fenotipo del topo con deficit di *SAP* presenta alcuni sintomi del XLP, come l'iperproliferazione dei linfociti T, una inappropriata citotossicità delle cellule NK mediata da 2B4 e difetti della risposta immunitaria umorale con un difetto nella formazione del centro germinativo [150].

ALPS e DALD presentano un simile quadro clinico e una simile difettiva funzionalità di Fas, ma si distinguono per l'espansione dei linfociti T DN, una caratteristica che è presente solo nell'ALPS. Questa differenza è importante da un punto di vista diagnostico in quanto la ricerca delle cellule T DN è una analisi di laboratorio di prima linea nella diagnosi dell'ALPS, ma potrebbe anche essere indicativa di differenze immunopatologiche tra ALPS e DALD dal momento che è stato proposto che queste cellule possano svolgere un ruolo diretto nella genesi dell'ALPS, ad esempio producendo interleuchina 10 (IL-10), che presenta valori elevati nell'ALPS (soprattutto nell'ALPS Ia) ma non nella DALD. Nonostante queste differenze, questo lavoro su *SAP* e altri lavori precedenti su osteopontina e perforina indicano che il background genetico di predisposizione all'ALPS e DALD è simile, in quanto variazioni dei geni di queste proteine predispongono ad entrambe le malattie.

In passato è stato proposto che le variazioni nei geni di osteopontina e perforina possono cooperare con il difetto di Fas nello sviluppo di ALPS e DALD alterando l'efficienza di

meccanismi alternativi dello spegnimento della risposta immunitaria, ovvero inibendo rispettivamente l'AICD e la citotossicità cellulo-mediata. Inoltre i difetti di perforina e Fas possono cooperare con il difetto di Fas anche nel ridurre l'efficienza della eliminazione delle infezioni virali, il che potrebbe a sua volta favorire l'iperproliferazione linfocitaria e lo sviluppo di autoimmunità per mimetismo molecolare [91].

Nel caso di *SAP*, l'effetto predisponente non è accreditabile a un decremento della funzione della citotossicità cellulo-mediata, poiché l'incremento dell'espressione di *SAP* associato con la variazione -346T dovrebbe piuttosto supportare queste cellule con il difetto di Fas. Viceversa si può supporre che l'effetto predisponente dell'allele -346T sia dovuto ad un incremento della costimolazione mediata da *SAP* che potrebbe incrementare la proliferazione linfocitaria e/o inibire la loro apoptosi. Questo effetto sarebbe necessariamente mediato dall'azione di 2B4 sulla citotossicità cellulo-mediata e sulla secrezione di IFN γ , ma potrebbe anche coinvolgere altri membri della famiglia di SLAM che potrebbero supportare l'interazione tra linfociti B e T nei centri germinativi, favorendo l'iperplasia dei linfonodi e la produzione di autoanticorpi. In linea con questa possibilità, è stato in passato suggerito il coinvolgimento di vari membri della famiglia di SLAM in processi autoimmuni sulla base dell'aumento della loro espressione nei linfociti effettori dell'artrite reumatoide, dell'associazione di variazioni polimorfiche dei loro geni con malattie autoimmuni e delle caratteristiche autoimmuni di topi knock out per questi geni [115].

La possibilità che *SAP* svolga un ruolo generale nell'autoimmunità è suggerito dal fatto che topi con un deficit di *SAP* sono protetti anche dalla EAE, modello animale della sclerosi multipla, e dal lupus indotto da pristano [115]. Tuttavia il fatto che la variazione -346C/T possa svolgere un ruolo generale è invece contraddetto dal fatto che questo lavoro non ha trovato nessuna associazione di questa variazione con la SM, confermando dati ottenuti in recenti studi di genome wide analysis. Questo risultato individua una differenza rispetto ai

risultati ottenuti sui geni di osteopontina e perforina le cui variazioni non solo erano associate ad ALPS e DALD, ma anche alla SM **[151,152,124]**.

CONCLUSIONI GENERALI DELLA TESI

Questa tesi dimostra che polimorfismi del gene di perforina, molecola coinvolta nella citotossicità cellulo-mediata e nei sistemi di immunoregolazione e di *SAP*, molecola coinvolta nell'attivazione dei linfociti NK e T, agiscono da fattori predisponenti all'insorgenza di due malattie autoimmuni: la SM (**sezione 1**) e l'ALPS (**sezione 2**).

La prima è una malattia infiammatoria cronica del sistema nervoso centrale (SNC) caratterizzata dalla progressiva perdita di mielina mediata dai linfociti T, la seconda è una rara malattia che insorge in età pediatrica ed è caratterizzata da un difetto di apoptosi Fas-mediata.

La **sezione 1** mostra come variazioni del gene di perforina possono favorire lo sviluppo della SM e suggeriscono che questo effetto sia mediato da una difettiva funzionalità NK o CTL. I risultati ottenuti hanno mostrato che la frequenza allelica dell'A91V è significativamente più alta nei pazienti rispetto ai controlli con un OR di 1.38 (95%CI =1.10-1.74). Inoltre i pazienti mostravano una elevata frequenza di variazioni "private" per cui la frequenza allelica complessiva delle variazioni era maggiore nei pazienti rispetto che ai controlli (17% vs 9%, $p = 0.0016$) e conferiva un OR = 2.06 (95% CI: 1.13-3.77) per la malattia. Dal momento che studi precedenti del nostro gruppo avevano dimostrato che variazioni del gene di perforina possono anche favorire lo sviluppo dell'ALPS e del diabete di tipo 1 e che lavori in corso in collaborazione con altri laboratori stanno evidenziando un'associazione di queste variazioni anche con il lupus eritematoso sistemico si può suggerire che questo gene svolga un ruolo generale nello sviluppo dell'autoimmunità. Questo ruolo potrebbe essere in qualche modo collegato con il ruolo assegnato a variazioni ereditarie del gene di perforina nello sviluppo di linfomi non Hodgkin, in quanto difetti nei processi di immuno-regolazione potrebbero anche funzionare da fattori promuoventi per lo sviluppo di queste malattie neoplastiche.

Nel caso del gene di *SAP*, (**sezione 2**) l'effetto predisponente per l'ALPS non è accreditabile ad un decremento della funzione di citotossicità cellulo-mediata, poiché la variazione associata alla malattia (-346T) sarebbe legata a un incremento dell'espressione di *SAP*, che dovrebbe favorire l'attivazione delle cellule NK. Viceversa l'effetto potrebbe essere legato a una aumentata funzione di recettori costimolatori della famiglia SLAM che usa *SAP* nella trasduzione del segnale e sono coinvolti in vari processi di attivazione dei linfociti T e B. Questo effetto funzionale sarebbe legato al fatto che lo SNP -346 colpisce un sito di metilazione del promotore del gene *SAP* (-346C) ed è in grado di modificare la regolazione di questo gene.

Nel complesso i dati riportati nei due lavori presentati in questa tesi indicano che variazioni “minori” di due geni che sono stati in passato associati a immunodeficienze piuttosto gravi a carico delle cellule citotossiche e caratterizzate da aspetti linfoproliferativi, la FHL e la XLP, possono essere una causa predisponente per lo sviluppo dell'autoimmunità. Questo suggerisce che l'autoimmunità e l'immunodeficienza, classicamente considerate come aspetti opposti dell'immunopatologia, possano almeno a volte avere alcune cause in comune.

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., Brugnoli 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., Chiochetti A., Ramenghi U. Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity. *Life Sciences*. 72: 2803-2824, 2003.
- [23] Bona G., DeFranco S., Chiochetti 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] Ebers GC, Sadovnick AD, and Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. *Nature*. 377:50-1,1995
- [27] Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood H, Thorpe JW, Miller DH, Compston DA. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology*. 44:11-5,1994
- [28] Bell JI, Lathrop GM. Multiple loci for multiple sclerosis. *Nat Genet*. 13:377-8,1996.

- [29] Ebers GC, Dyment DA. Genetics of multiple sclerosis. *Semin Neurol.* 18:295-9,1998.
- [30] Brynedal B, Duvefelt K, Jonasdottir G, et al. HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PLoS ONE.* 25;2:e664, 2007.
- [31] Yeo TW, De Jager PL, Gregory SG, et al. A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 61:228-236, 2007.
- [32] D'Alfonso S, Bolognesi E, Guerini FR, et al. A sequence variation in the MOG gene is involved in multiple sclerosis susceptibility in Italy. *Genes Immun.* 9:7-15,2008.
- [33] Seboun E, Robinson MA, Doolittle TH, Ciulla TA, Kindt TJ, Hauser SL. A susceptibility locus for multiple sclerosis is linked to the T cell receptor beta chain complex. *Cell.* 57:1095-100, 1989.
- [34] Tienari PJ, Wikstrom J, Sajantila A, Palo J, Peltonen L. Genetic susceptibility to multiple sclerosis linked to myelin basic protein gene. *Lancet.* 340:987-91,1992.
- [35] Almeras L, Meresse B, Seze JD, Lefranc D, Dubucquoi S, Fajardy I, Vermersch P, Prin L. Interleukin-10 promoter polymorphism in multiple sclerosis: association with disease progression. *Eur Cytokine Netw.* 13:200-6, 2002.
- [36] Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Sasaki H, Tashiro K. Genetic polymorphisms of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist in association with multiple sclerosis in Japanese patients. *J Neuroimmunol.* 118:295-9, 2001.
- [37] Schmidt S, Barcellos LF, DeSombre K, Rimmler JB, Lincoln RR, Bucher P. Association of polymorphisms in the apolipoprotein E region with susceptibility to and progression of multiple sclerosis. *Am J Hum. Genet.* 70: 708-717, 2002.
- [38] International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A, Sawcer S, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med.* 357:851-862, 2007.

- [39] Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, Sobel RA, Lock C, Karpuj M, Pedotti R, Heller R, Oksenberg JR, Steinman L. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science*. 294:1731-5, 2001.
- [40] Chiocchetti A, Comi C, Indelicato M, et al. Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *J Neuroimmunol* . 63: 172-178, 2005.
- [41] Castelli L, Comi C, Chiocchetti A et al. ICOS gene haplotypes correlate with IL 10 secretion and multiple sclerosis evolution. *J Neuroimm*. 186:193-8, 2007.
- [42] Johnson, RT. The Virology of Demyelinating Diseases. *Ann Neurol*. 36:S54-D60, 1994.
- [43] Haahr S, Munch M, Christensen T, Meller-Larson A, Hvas J. Cluster of multiple sclerosis patients from Danish Community. *Lancet*. 349:9056, 1997.
- [44] Jacobson S, Flerlage ML, and McFarland HF. Impaired measles virus-specific cytotoxic T cell response in multiple sclerosis. *J Exp Med*. 162:839-50, 1985.
- [45] Dean G, and Kurtzke JF. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med* . 3: 725-9, 1971.
- [46] Alter M, Leibowitz U, and Speer J. Risk of multiple sclerosis related to age at immigration to Israel. *Arch. Neurol*. 15: 234-7, 1966.
- [47] Kurtzke JF. MS epidemiology worldwide. One view of current status. *Acta. Neurol. Scand. Suppl*. 161:23-33, 1995.
- [48] Kurtzke JF. The Epidemiology of Multiple Sclerosis. In "Multiple Sclerosis: Clinical and pathogenetic basis" (Cedric D. Raine, Ed.) 91-139 Chapman and Hall, London, 1997
- [49] Henson TE, Brody JA, Sever JL, Dyken ML, and Cannon J. Measles antibody titers in multiple sclerosis patients, siblings, and controls. *JAMA*. 211:1985-9, 1970.

- [50] Alperovitch A, Berr C, Cambon-Thomsen A, Puel J, Dugoujon JM, Ruidavets JB, and Clanet M. Viral antibody titers, immunogenetic markers, and their interrelations in multiple sclerosis patients and controls. *Hum Immunol.* 31:94-9, 1991.
- [51] Sriram S, Stratton CW, Yao S, Tharp A, Ding L, Bannan JD, Mitchell WM. Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 46: 6-14, 1999.
- [52] Yao SY, Stratton CW, Mitchell WM, Sriram S. CSF oligoclonal bands in MS include antibodies against Chlamydia antigens. *Neurology.* 56:1168-76, 2001.
- [53] Jahnke U, Fischer EH, and Alvord EC. Sequence homology between certain viral proteins and proteins related to encephalomyelitis and neuritis. *Science.* 229:282, 1985.
- [54] Jacobson S. Association of human herpesvirus-6 and multiple sclerosis: here we go again? *J. Neurovirol.* 4: 471-473, 1998.
- [55] Lassmann H. Mechanisms of demyelination and tissue destruction in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg.* 104:168-71, 2002.
- [56] Cannella B, Raine C. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 37:424-35, 1995.
- [57] Hauser SL, Fleischnick E, Weiner HL, Marcus D, Awdeh Z, Yunis EJ, Alper CA. Extended major histocompatibility complex haplotypes in patients with multiple sclerosis. *Neurology.* 39:275-7, 1989.
- [58] Burmham, J.A., Wright, R.R., Dreisbach, J. and Murray, R.S. The effect of high-dose steroids on MRI gadolinium enhancement in acute demyelinating lesions. *Neurology.* 41:1349-54, 1991.
- [59] Stone, L.A., Frank, J.A., Albert, P.S. Bash, C., Smith, M.E., Maloni, H., and McFarland, H.F. The effect of interferon- β on blood-brain-barrier disruptions

- demonstrated by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 37:611-9, 1995.
- [60] Tourtellotte, W.W. The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis In Handbook of Clinical Neurology 3 (revised series), *Demyelinating Diseases* (eds P.J. Vinken, G.W. Bruyn, H.L. Klawans and J.C. Koetsier) 79-130, Amsterdam/New York, Elsevier, 1985
- [61] Swanborg RH. Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 77:4-13, 1995.
- [62] Fritz RB, and McFarlin DE. Encephalitogenic epitopes of myelin basic protein, In "Antigenic Determinants and Immune Response" (ed. E.E. Sercarz) *Chem. Immunol.* 46, Basle, Karger. pp 101-25, 1989.
- [63] Flugel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, Ellwart JW, Willem M, Lassmann H, Wekerle H. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity.* 14:547-60, 2001.
- [64] Owens T, Wekerle H, Antel J. Genetic models for CNS inflammation. *Nat Med.* 7:161-6, 2001.
- [65] Steinman L. Some misconceptions about understanding autoimmunity through experiments with knockouts. *J Exp Med.* 185:2039-41, 1997.
- [66] Hohlfeld R, Wiendl H. The ups and downs of multiple sclerosis therapeutics. *Ann Neuro.* 49:281-4, 2001.
- [67] Martin R, Sturzebecher CS, McFarland HF. Immunotherapy of multiple sclerosis: where are we? Where should we go? *Nat Immunol.* 2:785-8, 2001.
- [68] Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell.* 85:299-302, 1996.

- [69] Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Schindler, J. and Johnson, K.P. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* . 37:1097-102, 1987.
- [70] Weiner H. Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell mediated autoimmune disease. *Arch.Neurol*. 61: 1613-1615, 2004.
- [71] Bar-Or A, Oliveira EM, Anderson DE, Hafler DA. Molecular pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 100:252-9, 1999.
- [72] Lassman H, and Ranshoff RM: The CD4-Th1 model for multiple sclerosis. A critical (correction of crucial) re-appraisal. *Trends Immun* . 25:132-137, 2004.
- [73] Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, et al. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* . 123:1174-83, 2000.
- [74] Johnson AJ, Suidan GJ, McDole J and Pirko I. The CD8 cell in multiple sclerosis: suppressor or mediator of neuropathology? *Intern Rev of Neurol* . 79:73-97, 2007.
- [75] Bolitho P., Voskoboinik I., Trapani J.A. et al. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr Opin Immunol*. 19: 339-47, 2007.
- [76] 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.
- [77] Lichtenheld M.G., Olsen K.J., Lu P. et al. Structure and function of human perforin. *Nature*. 335: 448-5, 1988.
- [78] 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.

- [79] Nalefski E.A., Falke J.J. The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci.* 5: 2375-90, 1996.
- [80] 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.
- [81] 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.
- [82] 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.
- [83] 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.
- [84] 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.
- [85] Stepp S.E., Dufourcq-Lagelouse R., Le Deist. et al. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science.* 286: 1957–1959, 1999
- [86] 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.
- [87] 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.

- [88] Marjorie Côte,1,2 Mickaël M. Ménager,1,2 Agathe Burgess, Munc18-2 deficiency causes familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 and impairs cytotoxic granule exocytosis in patient NK cells *J. Clin. Invest.* 119:3765–3773, 2009.
- [89] Voskoboinik I., Smyth M.J., Trapani J.A. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 6: 940-952, 2006.
- [90] Henter J.I., Arico M., Elinder G. et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: primary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 12: 417-433, 1998.
- [91] Clementi R, Chiocchetti A, Cappellano G, et al. Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function. *Blood.* 108(9):3079-84, 2006.
- [92] Orilieri E, Cappellano G, Clementi R, et al. Variations of the perforin gene in patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 57(4):1078-83, 2008.
- [93] Veillette A. SLAM family receptors regulate immunity with and without SAP-related adaptors *J Exp Med.* 199, 1175-1178, 2004
- [94] Ma C.S., Nichols K.E., Tangye S.G. Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu Rev Immunol.* 25, 337-379, 2007.
- [95] Mikhalap S.V., Shlapatska L.M., Yurchenko O.V., Yurchenko M.Y., Berdova G.G., Nichols k., Clark E.A., Sidorenko S.P. The adaptor protein SH2D1A regulates signaling through CD150 (SLAM) in B cells. *Blood* 104, 4063-4070, 2004.
- [96] Nanda N., Andre P., Bao M., Clauser K., Deguzman F., Howie D., Conley P.B., Terhorst C., Phillips D.R. Platelet aggregation induces platelet aggregate stability via SLAM family receptors signaling. *Blood.* 106, 3028-3034, 2005.

- [97] Veillette A., Dong Z., Latour S. Consequence of the SAP-SLAM signaling pathway in innate like and conventional lymphocytes. *Immunity*. 27, 698-708, 2007.
- [98] Howie D., Simarro M., Sayos J., Guirado M., Sancho J., Terhorst C. Molecular dissection of the signaling and costimulatory functions of CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation. *Blood*. 99, 957-965, 2002.
- [99] Latour S., Veillette A. Molecular and immunological basis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immun Rev* 192, 212-224, 2003.
- [100] Cocks B.G., Chang, C., Carballido J.M., Yssel H., de Vries J.E, Aversa G. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature*. 376, 260-263, 1995.
- [101] Wang N., Satoskar A., Faubion W., Howie D., Okamoto S., Feske S., Gullo C., Clarke K., Roriguez Sosa M., Sharpe A., Terhorst C. The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. *J Exp Med*. 199, 1255–1264, 2004.
- [102] Hwang P. M., Li C., Morra M., Lillywhite J., Muhandiram D. R., Gertler F., Terhorst C., Kay L. E., Pawson T., Forman-Kay J. D., Li S. C. A Three-pronged binding mechanism for the SAP/SH2D1A SH2 domain :structural basis and relevance to the XLP syndrome. *EMBO J*. 21, 314-23, 2002.
- [103] Latour .S., Gish G., Helgason C.D., Humphries R.K., Pawson T., Veillette A. Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nature Immunol* .2, 681-690, 2001.
- [104] Latour .S., Roncagalli R., Chen R., Bakinowski M., Shi X., Schwartzberg P.L., Davidson D., Veillette A. Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signaling in immune regulation. *Nat Cell Biol*. 2, 149-154, 2003.

- [105] Cannons J.L., Yu L.J., Hill B., Mijares L.A., Dombroski D., Nichols K.E., Antonellis A., Koretzky G.A., Gardener K., Schwartzberg P.L. SAP regulates T(H)2 differentiation and PKC-theta-mediated activation of NF-kappaB1. *Immunity*. 21, 693-706, 2004.
- [106] Sylla B.S., Murphy K., Cahir-McFarland E, Lane W.S., Mosialos G., Kieff E. The X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SH2D1A associates with p62dok (Dok1) and activates NF-kappaB. *Proc Nat Acad Sci USA*. 97, 7470-7475, 2000.
- [107] Morra M., Lu J., Poy F., Martin M., Sayos J., Calpe S., Gullo C., Howie D., Rietdijk S., Thompson A., Coyle A. J., Denny C., Yaffe M. B., Engel P., Eck M. J., Terhorst C. Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *EMBO J*. 20, 5840-5852, 2001.
- [108] Nichols K. E., Ma C. S., Cannons J. L., Schwartzberg P. L., Tangye S. G. Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev*. 203, 180-199, 2005.
- [109] Sanzone S., Zeyda M., Saemann M.D., Soncini M., Holter W., Fritsch G., Knapp W., Condotti F., Stulnig T.M., Parolini O. SLAM-associated protein deficiency causes imbalanced early signal transduction and blocks downstream activation in T cells from X-linked lymphoproliferative disease patients. *J Biol Chem*. 278, 29593-29599, 2003.
- [110] Ma C.S., Hare N.J., Nichols K.E., Dupré L., Andolfi G., Roncarolo M., Adelstein S., Hodgkin P.D. Tangye S.G. Impaired humoral immunity in X-linked lymphoproliferative disease is associated with defective IL-10 production by CD4 T cells. *J Clinical Inv*. 115, 1049-1059, 2005.
- [111] Crotty S., Megan M., McCausland, Rachael D., Aubert E., Wherry J., Ahmed R. Hypogammaglobulinemia and exacerbated CD8 T cells mediated immunopathology in SAP-deficient mice with chronic LCMV infection mimics human XLP disease. *Blood*. 10, 1182-1192, 2006.

- [112] Czar M.J., Kersh E.N., Mijares L.A., Lanier G., Lewis J., Yap G., Chen A., Sher A., Duckett C.S., Ahmed R., Schwartzberg P.L. Altered lymphocyte responses and cytokine production in mice deficient in the X-linked lymphoproliferative disease gene SH2D1A/DSHP/SAP. *PNAS*. **98**, 7449-7454, 2001.
- [113] Davidson D., Shi X., Zhang S., Wang H., Nemer M., Ono N., Ohno S., Yanagi Y., Veillette A. Genetic evidence linking SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product, to Src-related kinase FynT in T(H)2 cytokine regulation. *Immunity*. **21**, 707-717, 2004.
- [114] Peng L., Target identification and validation in systemic autoimmunity. *Immunol Res*. **32**(13):2019, 2005.
- [115] Chan AY, Westcott JM, Mooney JM, Wakeland EK, Schatzle JD. The role of SAP and the SLAM family in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. **18**(6):656-64, 2006.
- [116] Gasque P, Jones J, Singhrao SK, Morgan P. Identification of an Astrocyte Cell Population from Human Brain that Expresses Perforin; a Cytotoxic Protein Implicated in Immune Defence. *J Exp Med*. **187**: 451 – 460, 1998.
- [117] Zeine R, Cammer W, Barbarese E, Liu CC, Raine CS. Structural dynamics of oligodendrocyte lysis by perforin in culture : relevance to multiple sclerosis. *The Journal of Neuroscience*. **64** : 380 – 391, 2001.
- [118] Howe C.L and Rodriguez, M. Remyelination as neuroprotection. In: Multiple Sclerosis as a Neuronal Disease. S.G. Waxman, Ed. *Elsevier Academic Press*. 389–419, 2005.
- [119] McDonald WI, Compston A., Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. **50**:121–127, 2001.

- [120] Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology*. 48:907–911, 1996.
- [121] International Committee of Medical Journal Editors, Protection of patients' rights to privacy. *Br Med J* .311:1272, 1995.
- [122] Mehta PA, Davies SM, Kumar A, et al. Perforin polymorphism A91V and susceptibility to B-precursor childhood acute lymphoblastic leukaemia: a report from the Children's Oncology group. *Leukemia*. 20: 1539-41, 2006.
- [123] Giordano M, D'Alfonso S, Momigliano-Richiardi P. Genetics of multiple sclerosis: linkage and association studies. *Am J Pharmacogenomics* . 2:37-58, 2002.
- [124] Solomu E, Gibellini F, Stewart B. Perforin gene mutations in patients with acquired aplastic anemia. *Blood* . 109:5234-7, 2007.
- [125] Cannella S, Santoro A, Bruno G. Germline mutations of the perforin gene are afrequent occurrence in childhood anaplastic large lymphoma. *Amer Cancer Soc*. 2566-2570, 2007.
- [126] 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.
- [127] 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, 2006.
- [128] Voskoboinik I, Sutton VR, Ciccone A, et al. Perforin activity and immune homeostasis: the common A91V polymorphism in perforin results in both pre- and post-synaptic defects in function. *Blood*. 110:1184-90, 2007.
- [129] Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* . 6:940-52, 2006.

- [130] Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet.* 3: 285–298, 2002.
- [131] Martin MM, Buckenberger JA, Jiang J, Malana GE, Nuovo GJ, Chotani M *et al.*. The human angiotensin II type 1 receptor +1166 A/C polymorphism attenuates microRNA-155 binding. *J Biol Chem.* 282:24262-24269, 2007.
- [132] Lunemann JD, Munz C. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Curr Neurol.* 7:253-8, 2007.
- [133] Comi C, Leone M, Bonisconi S, *et al.* Defective T cell fas function in patients with multiple sclerosis. *Neurology.* 55:921-7, 2000.
- [134] Chiocchetti A, Comi C, Indelicato M, Castelli L, Mesturini R, Bensi T *et al.* Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *J Neuroimmunol.* 63: 172-178, 2005.
- [135] Vogt MH, Lopatinskaya L, Smits M, Polman CH, Nagelkerken L. Elevated osteopontin levels in active relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 53: 819-822, 2003.
- [136] Veillette A. Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol.* 6(1):56-66, 2006.
- [137] Veillette A. SAP: a molecular switch regulating the immune response through a unique signalling mechanism. *Eur. J. Immunol.* 33:1141-1144, 2003.
- [138] Howie D., Sayos j., Terhorst C., Morra M. *Curr Opin Immunol* 12, 474–478, 2000.
- [139] Komori H, Furukawa H, Mori S *et al.* A Signal Adaptor SLAM-Associated Protein Regulates Spontaneous Autoimmunity and Fas-Dependent Lymphoproliferation in MRL-*Faslpr* Lupus Mice. *J. Immunol.* 176: 395-400, 2006.
- [140] Ornella Parolini · Andreas Weinh_usel ·Birgit Kagerbauer *et al.* Differential methylation pattern of the X-linked lymphoproliferative (XLP) disease gene SH2D1A

- correlates with the cell lineage-specific transcription. *Immunogenetics* . 55:116-121, 2003.
- [141] Maric I, Pittaluga S, Dale JK et al. Histologic features of sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am J Surg Pathol.* 29(7):903-11, 2005.
- [142] Poy, F., M. B. Yaffe, J. Sayos, K et al. 1999. Crystal structures of the XLP protein SAP reveal a class of SH2 domains with extended, phosphotyrosine-independent sequence recognition. *Mol. Cell.* 4: 555–561, 1999.
- [143] Sayos, J., C. Wu, M. Morra et al. 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature.* 395: 462–469, 1999.
- [144] Tangye, S. G., S. Lazetic, E. Woollatt et al. Human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J. Immunol.* 162: 6981–6985,1999.
- [145] Sayos, J., M. Martin, A. Chen, et al. Cell surface receptors Ly-9 and CD84 recruit the X-linked lymphoproliferative disease gene product SAP. *Blood* . 97: 3867–3874, 2001.
- [146] Valdez, P. A., H. Wang, D. Seshasayee, et al. NTB-A, a new activating receptor in T cells that regulates autoimmune disease. *J. Biol. Chem.* 279: 18662–18669, 2004.
- [147] Katagiri, T., K. Urakawa, Y. Yamanashi, et al. Overexpression of src family gene for tyrosine-kinase p59fyn in CD4_CD8_ T cells of mice with a lymphoproliferative disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 10064–10068, 1989.
- [148] Veillette A., S. Latour. SLAM family receptors regulate immunity with and without SAP-related adaptors. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 277–285, 2003.
- [149] Engel P., Eck M.J., Terhorst C. The SAP and SLAM families in immune response and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 813–821, 2003.

- [150] Schwartzberg PL, Mueller KL, Qi H, Cannons JL. SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function *Nat Rev Immunol.* 9(1):39-46, 2009.
- [151] 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. High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood.* 103(4):1376-82, 2004.
- [152] 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.* 9(5):438-44, 2008.

