

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

Dipartimento di Scienze Mediche



**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare**

Ciclo XXIV (2008-2011)

**Studio e caratterizzazione
di fattori genetici coinvolti nello sviluppo
della sindrome autoimmune
linfoproliferativa**

TUTOR

Prof. Umberto Dianzani

CANDIDATO

Dr. Matteo Melensi

INDICE

Introduzione	Pag 6
SEZIONE 1:	Pag 36
<i>Presenza di mutazioni a carico dei geni di Fas, Munc13-4 e XIAP in un paziente affetto da una forma atipica di ALPS</i>	
Materiali e Metodi, sezione 1	Pag 47
Discussione, sezione 1	Pag 55
SEZIONE 2:	Pag 58
<i>Mutazioni di Munc13-4 come fattore di rischio per lo sviluppo di ALPS/DALD</i>	
Materiali e Metodi, sezione 2	Pag 65
Discussione, sezione 2	Pag 69
SEZIONE 3:	Pag 73
<i>Polimorfismi del gene di SAP come fattore di rischio per lo sviluppo di ALPS/DALD</i>	
Materiali e Metodi, sezione 3	Pag 85
Discussione, sezione 3	Pag 90
Conclusioni Generali	Pag 94
Bibliografia	Pag 95
Articoli	Pag 105

ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI

Serum cytokine profile during *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer)

Zavattaro E., Mesturini R., Dossou A., **Melensi M.**, Johnson R., C., Sopoh G., Dianzani U., Leigheb G. (2010) *Int J Dermatol* **49**, 1297-1302

The -346T polymorphism of the SH2D1A gene is a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation in males with defective FAS function

Boggio E., **Melensi M.**, Bocca S., Chiocchetti A., Comi C., Clemente N., Orilieri E., Soluri M., F., D'Alfonso S., Mechelli R., Gentile G., Poggi A., Solvetti M., Ramenghi U., Dianzani U. *Human Immunol*, IN PRESS

Deleterious mutations of FAS, XIAP and UNC13D genes in a patient with a complex lymphoproliferative phenotype

Melensi M., Aricò M., Boggio E., Soluri M., F., Dianzani I., Ramenghi U., Dianzani U., Chiocchetti A. *J Allergy Clin Immuno* SUBMITTED

RIASSUNTO

Uno studio ha dimostrato che mutazioni eterozigoti a carico del gene di perforina (*PRF1*), responsabili dello sviluppo della linfoistiocitosi emofagocitica familiare (FHL) in doppia eterozigosi, possono agire da fattori predisponenti per lo sviluppo della sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS) e della malattia linfoproliferativa di Dianzani (DALD) in soggetti portatori di difetti funzionali a carico del recettore di morte Fas.

L'ALPS si sviluppa generalmente in età pediatrica ed è caratterizzata da 1) difetti dell'apoptosi linfocitaria dovuti a mutazioni a carico del sistema Fas/FasL; 2) sviluppo di manifestazioni autoimmuni, con associazioni variabili di anemia, trombocitopenia, neutropenia; 3) linfadenopatia e/o splenomegalia; 4) espansione di linfociti T $\text{TCR}\alpha\beta^+$ doppi negativi CD4^- e CD8^- (DNT). La DALD è una variante dell'ALPS in cui i pazienti presentano un quadro clinico di tipo ALPS ma sono privi dell'espansione dei linfociti DNT.

Il modello animale dell'ALPS è rappresentato dai topi *MRL lpr/lpr* e *MRL gld/gld* , portatori di una mutazione in omozigosi con perdita di funzione, rispettivamente nei geni di Fas e FasL. 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. La penetranza delle mutazioni causali dell'ALPS è spesso incompleta e lo sviluppo della malattia è favorito dal background genetico.

L'obiettivo principale di questa tesi è stato quello di estendere l'osservazione fatta nei pazienti con FHL al fine di valutare in modo sistematico il grado di sovrapposizione genetica tra ALPS o DALD e altre malattie ereditarie caratterizzate da linfoproliferazione; in particolare sono state ricercate in pazienti con ALPS o DALD mutazioni a carico dei geni di Munc13-4 e syntaxina-11, coinvolti nella FHL, e di XIAP e SAP coinvolti nella malattia linfoproliferativa legata al cromosoma X (XLP).

La FHL è una malattia genetica eterogenea che si sviluppa generalmente nel primo anno di vita ed è caratterizzata da una ridotta capacità dei linfociti NK e T citotossici di eliminare le cellule infettate da virus, a cui consegue linfoproliferazione. La malattia può essere causata da mutazioni deleterie a carico dei geni di perforina, Munc13-4, Syntaxina-11 o Munc18-2. La XLP, invece, è una malattia dovuta a mutazioni a carico del gene di SAP o di XIAP, che determinano deficit funzionali e di sviluppo delle cellule NK e NKT e causano un'aumentata suscettibilità alle infezioni da Epstein Barr Virus (EBV).

I risultati descritti nella **Sezione 1** hanno permesso di identificare e caratterizzare un paziente portatore di mutazioni a carico dei geni Fas (*FAS*), XIAP (*XIAP*) e Munc13-4 (*UNC13D*); l'analisi funzionale delle mutazioni ha dimostrato che tutte le variazioni avevano un effetto deleterio sul rispettivo prodotto genico. La mutazione di *XIAP* non permetteva l'espressione della proteina a causa della degradazione dell'mRNA, la mutazione di *FAS* causava una ridotta espressione del recettore e quindi una ridotta capacità di attivare caspasi-8, mentre la mutazione di *UNC13D* riduceva la funzione della proteina, alterando il processo di secrezione dei granuli citotossici.

Il fenotipo del paziente suggerisce che queste mutazioni cooperano al quadro clinico, probabilmente agendo su diversi meccanismi coinvolti nello spegnimento della risposta immunitaria e nella risposta citotossica antivirale. Il quadro linfoproliferativo del paziente poteva essere legato sia ad una prolungata sopravvivenza dei linfociti attivati a causa di un difetto nello spegnimento della risposta immunitaria, sia ad una loro iperproliferazione mirata a compensare la loro ridotta efficacia nel contrastare le infezioni virali.

I risultati descritti nella **Sezione 2** hanno permesso di identificare anche la presenza di frequenti mutazioni a carico del gene di Munc13-4 nei pazienti con ALPS e DALD: sono state identificate sette variazioni eterozigoti in grado di determinare un cambio aminoacidico a livello della proteina. Quattro variazioni erano già state descritte in banca dati in pazienti affetti da FHL o quadri simili mentre tre variazioni non erano mai state descritte. I dati hanno suggerito che le variazioni nel gene di *UNC13D* potrebbero essere considerate parte di un "background" oligogenico in grado di predisporre allo sviluppo dell'ALPS.

I risultati descritti nella **Sezione 3** hanno permesso di identificare il polimorfismo -346C>T del gene di SAP come possibile fattore predisponente per lo sviluppo di ALPS e DALD in soggetti maschi portatori di difetti funzionali a carico di Fas. I maschi affetti da ALPS o DALD hanno mostrato una frequenza più elevata dell'allele -346T rispetto ai controlli. L'allele -346C è risultato essere un sito di metilazione che viene perso nei portatori dell'allele -346T. Il polimorfismo sembra avere effetti funzionali in quanto i soggetti portatori dell'allele -346T esprimono livelli più elevati di SAP nelle cellule NK, nei linfociti T citotossici (CTL) rispetto ai portatori di -346C, e inoltre producono livelli inferiori di IFN- γ in seguito ad attivazione linfocitaria. Questi dati confermano i risultati ottenuti da uno studio su topi *MRLlpr/lpr*, nei quali una mutazione di *SAP* determinava una diminuzione nell'espressione della proteina, cui conseguiva una attenuazione dei principali parametri di malattia. L'effetto predisponente dell'allele -346T potrebbe essere legato alla minore secrezione di IFN- γ associata a questo allele; infatti questa citochina è capace di aumentare l'espressione di FasL nei linfociti T helper, per cui una sua ridotta secrezione potrebbe peggiorare il difetto funzionale di Fas dei pazienti. E' pertanto possibile ipotizzare che una parziale inibizione farmacologica di SAP possa in futuro essere utile per il controllo della malattia.

Introduzione

Il sistema immunitario e l'apoptosi

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

I progenitori dei linfociti B e T maturano rispettivamente nel midollo osseo e nel timo; durante questa fase il riarrangiamento dei geni per i recettori dell'antigene (Ig per i linfociti B e TCR per i linfociti T) genera in modo casuale un grande numero di recettori [1].

Il repertorio di linfociti che esprimono un recettore appropriato è ottenuto con un processo di selezione clonale che porta alla morte per apoptosi dei linfociti con alta affinità per gli antigeni self [1]. Grazie a questo processo, il repertorio di recettori per l'antigene che raggiunge il sangue periferico sarà costituito quasi esclusivamente da recettori per antigeni non-self [2].

Tuttavia, la delezione dei cloni linfocitari autoreattivi non interessa tutti i cloni poiché non tutti gli antigeni self sono rappresentati nel midollo osseo e nel timo. L'immissione in periferia di questi linfociti T non porta necessariamente allo sviluppo di malattie autoimmuni in quanto queste cellule possono ancora essere controllate da meccanismi di tolleranza periferica [3].

L'attivazione del linfocita T, che porta alla sua proliferazione e differenziamento a linfocita effetore, richiede due segnali distinti [4]:

- un primo segnale generato dall'interazione del recettore con l'antigene presentato su molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC)

- un secondo segnale proveniente da molecole costimolatorie che interagiscono con i loro rispettivi ligandi presenti sulle cellule presentanti l'antigene (APC) solo quando sono attivate da un processo infiammatorio.

La molecola co-stimolatoria meglio conosciuta dei linfociti T è CD28, che interagisce con i ligandi CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2) espressi dalle APC attivate [4].

Il riconoscimento dell'antigene in assenza del secondo segnale conduce ad uno stato di quiescenza (anergia) o apoptosi del linfocita. In questo modo, l'attivazione dei linfociti avviene soltanto in un contesto infiammatorio durante il quale le APC esprimono molecole costimolatorie e questo riduce il rischio di attivazioni improprie contro il self [5].

L'apoptosi svolge un ruolo importante anche nella citotossicità cellulo-mediata. I linfociti T citotossici (CTL), infatti, si legano al loro bersaglio (cellule tumorali o infettate da virus) e lo uccidono innescando l'apoptosi attraverso vari meccanismi:

- liberazione di perforina e granzimi, la prima polimerizza sulla membrana del bersaglio producendo dei pori in cui passano i granzimi in grado di attivare varie caspasi che sono i principali effettori dell'apoptosi;
- espressione di FasL che lega il recettore Fas espresso dalla cellula bersaglio e attiva le caspasi;

- produzione di $\text{TNF}\alpha$ e/o linfotossina che legano i rispettivi recettori attivando le caspasi.

Il processo apoptotico, inoltre, è fondamentale nello spegnimento della risposta immunitaria al fine di mantenere l'omeostasi numerica dei linfociti. Nel caso dei linfociti, esistono due meccanismi di controllo. Il primo meccanismo (sistema passivo) conduce alla morte dei linfociti che hanno risposto all'antigene. L'esaurimento dell'antigene determina una riduzione della secrezione di citochine importanti per la sopravvivenza cellulare e dell'espressione dei loro recettori da parte dei linfociti. Il calo degli stimoli di sopravvivenza causa una diminuzione dei livelli cellulari delle molecole antiapoptotiche e il conseguente innesco della via apoptotica intrinseca (ACAD, activation cell-autonomous death) [6-7].

Il secondo meccanismo (sistema attivo) elimina i linfociti alcuni giorni dopo la loro attivazione. Questa morte è favorita da una riattivazione del linfocita da parte dell'antigene (AICD, activation-induced cell death) ed è legata all'azione di alcuni recettori appartenenti alla famiglia del TNF-receptor (TNFR) coinvolti nella via estrinseca dell'apoptosi tra cui Fas [6-7].

Recettori di morte

Fas/Apo1/CD95 è una glicoproteina transmembrana di 45-48 kDa di tipo I [8-9] appartenente alla superfamiglia dei TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) che comprende più di venti membri tra cui recettori di morte e recettori di crescita. Una classificazione individua una sottofamiglia di TNFR deputati alla trasmissione di segnali apoptotici e pertanto detti death receptors [9-10].

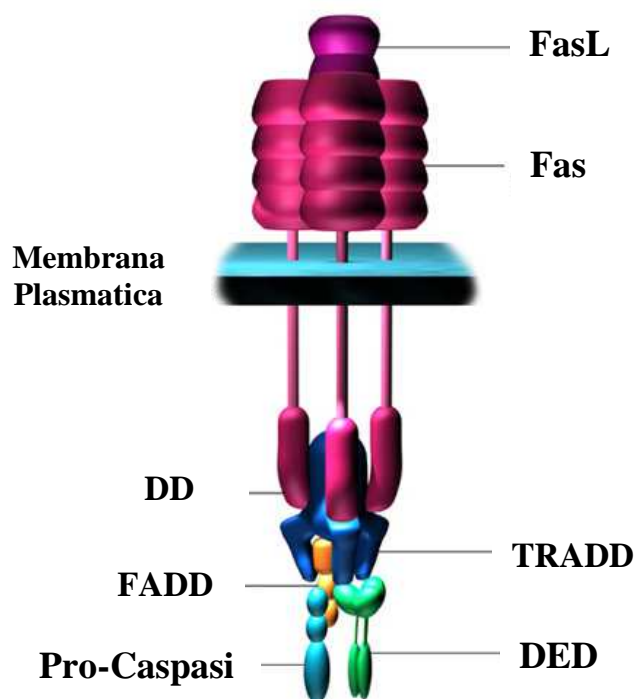
I death receptors includono, oltre a Fas, altri recettori tra cui TNFR1, TNFR2 e il recettore per la linfotossina. Altri membri della famiglia TNFR, che non sono death receptor, includono il recettore per NGF (Nerve Growth Factor), le molecole CD30, CD27 e CD40 [11].

Tutti i death receptors presentano una porzione intracitoplasmatica DD (death domain), necessaria per la trasmissione del segnale di morte e una porzione extracellulare che presenta una regione con tre domini di cisteina (cysteine-rich domains CRD1, 2 e 3) e un dominio PLAD (pre-ligand assembly domain). Questo dominio è localizzato nella porzione amino-terminale della molecola ed è importante per il legame con il ligando, ma è distinto dal sito di effettivo legame [12]. PLAD permette la trimerizzazione del recettore, evento fondamentale per il legame con il ligando che si presenta, a sua volta, in forma trimerica.

Il sistema Fas/FasL

Fas (CD95) è codificato dal gene *TNFRSF6* (o *FAS*), che nell'uomo è presente sul tratto cromosomico 10q24.1 e consiste di 9 esoni e 8 introni [13]. La proteina è costituita da 325 aminoacidi.

Fas è un recettore espresso dalla maggior parte dei tessuti e in modo particolare nei linfociti attivati la proteina forma un omotrimerico sulla membrana cellulare dopo il legame con la proteina FasL/CD95L codificata dal gene *TNFSF6*. Il gene nell'uomo è presente sul tratto cromosomico 1q23 e consiste di 5 esoni e 4 introni, la proteina è costituita da 281 aminoacidi [14]. Il sistema Fas/FasL è il sistema molecolare meglio caratterizzato nello spegnimento della risposta immunitaria e svolge due ruoli fondamentali [15]: da un lato rappresenta uno dei meccanismi attraverso cui i linfociti con capacità citotossiche uccidono il bersaglio; dall'altro lato i linfociti attivati esprimono elevati livelli di Fas e sono sottoposti alla regolazione negativa da parte di linfociti o altri tipi cellulari che esprimono FasL. E' stato osservato che FasL è espresso costitutivamente ad elevati livelli in alcuni tessuti considerati "immunologicamente privilegiati", come occhio e testicolo, perché sono in grado di escludere le cellule immunitarie uccidendole avvalendosi degli elevati livelli di FasL [16].

**Figura 1****Rappresentazione schematica del sistema Fas/FasL**

Il ligando extracellulare FasL interagisce con il recettore Fas e ne induce la trimerizzazione conducendo al reclutamento della molecola FADD (Fas-Associated Death Domain) e/o TRADD (TNFRSF1A-associated via death domain) e della procaspasi-8 che formano, in questo modo, un complesso detto DISC (Death Inducing Signaling Complex). FAS e FADD interagiscono con i loro domini DD (death domain) mentre FADD e caspasi-8 interagiscono attraverso un dominio DED (death-effector domain).

Le vie dell'apoptosi

Nel sistema immunitario, un'ampia varietà di stimoli possono attivare tre differenti vie di morte cellulare.

- La “via estrinseca” stimolata dall'interazione ligando-recettore che conduce alla formazione di un complesso in grado di attivare la cascata delle caspasi.
- La “via intrinseca” stimolata da condizioni di stress cellulare (mancanza di fattori di crescita, raggi UV, stimolazione con etoposide) che porta alla formazione di un complesso detto apoptosoma in seguito al rilascio di fattori proapoptotici da parte del mitocondrio.
- La “via di salvataggio” (autofagia) meccanismo per il mantenimento dell'omeostasi cellulare che in alcune circostanze può condurre alla morte cellulare.

Nella via estrinseca, i recettori (death receptor) appartenenti alla famiglia dei recettori TNFR interagiscono con i rispettivi ligandi extracellulari (appartenenti alla famiglia del TNF [9-17]) e inducono la via apoptotica. Un esempio è il ligando extracellulare FasL che interagisce e induce trimerizzazione del recettore transmembrana Fas/CD95/Apo1 conducendo al reclutamento di una molecola citosolica adattatrice FADD (Fas-Associated Death Domain) e della procaspasi-8 che formano, in questo modo, un complesso detto DISC (Death-Inducing Signaling Complex) (Figura 1) [18-19].

FAS e FADD interagiscono con i loro domini DD (death domain) mentre FADD e caspasi-8 interagiscono attraverso un dominio DED (death-effector domain).

L'attivazione di caspasi-8, mediante taglio proteolitico, innesca una cascata attivatoria che coinvolge la caspasi-10 e le caspasi -3,-7,-6 che, nella loro forma attiva, sono in grado di agire su specifici substrati cellulari [10-18].

Caspasi-8, inoltre, è legata alla via intrinseca apoptotica (generalmente indotta da stress e attivata da caspasi-9) attraverso due meccanismi diversi: la scissione proteolitica della molecola Bid e la sintesi di ceramide indotta dall'attivazione di sfingomielinasi acide/neutre [20]. I frammenti di Bid e ceramide, traslocando sulla membrana esterna del mitocondrio, interagiscono con BAX (BCL-2 associated protein X) e BAK (BCL-2 antagonist/killer) permettendo a quest'ultimi di oligomerizzare. Questo stimola il rilascio di citocromo-c nel citoplasma che, legandosi ad Apaf-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1) e procaspasi-9, porta alla formazione di un complesso noto come apoptosoma [21-22]. In seguito a clivaggio, la caspasi-9 assume una conformazione attiva in grado di processare altre caspasi poste nelle vicinanze; ciò permette di innescare una cascata di trasduzione del segnale apoptotico che coinvolge le diverse caspasi effettrici e termina nell'idrolisi di substrati citosolici e nucleari.

In condizioni di stress moderato (ad es. carenza di fattori trofici) le cellule ricorrono a risorse alternative per mantenere la sopravvivenza cellulare (autofagia); le cellule sequestrano proteine e organelli invecchiati per riciclarne le diverse parti e assicurarsi la sintesi di enzimi e componenti necessari alla sopravvivenza. Tuttavia, una prolungata condizione di stress o un mancato controllo della regolazione dell'autofagia possono condurre alla "morte cellulare autofagica", indipendente dalle caspasi. Questa mostra peculiarità morfologiche simili all'apoptosi e sembra essere un passaggio indispensabile per l'inizio del processo apoptotico in quanto si è osservato che inibitori dell'autofagia inibiscono anche l'apoptosi mentre inibitori delle caspasi non inibiscono l'autofagia [23].

Le caspasi

Le caspasi sono una famiglia di cistein-proteasi in grado di idrolizzare i loro substrati in corrispondenza di residui di acido aspartico (Asp-X-X-Asp). Alcune caspasi possono idrolizzare il precursore di citochine al fine di attivarli (caspasi-1 e -11), altre innescano la propagazione dei segnali apoptotici (caspasi-8, -9 e -10), altre realizzano il programma apoptotico mediante scissione diretta di diverse proteine vitali per la cellula e mediante l'attivazione di processi trascrizionali all'interno del nucleo (caspasi-3, -6 e -7) [21-24]. Le caspasi vengono sintetizzate come fattori zimogeni inattivi (procaspasi) composti da tre principali subunità (un pro-domain e due porzioni catalitiche). Nei fattori zimogeni queste catene bloccano la formazione del sito attivo. Una volta attivate, le caspasi assumono una forma eterotetrameriche che permette la corretta disposizione del residuo catalitico e del sito per il substrato. L'attivazione può avvenire per autocatalisi o mediante taglio proteolitico operato da un'altra caspasi [25-26].

La famiglia delle caspasi coinvolte nella trasduzione del segnale mediata da Fas/FasL può essere suddivisa in base alla loro specificità di substrato, in due gruppi: caspasi iniziatrici (caspasi -8,-9, -10) che agiscono nelle prime fasi dell'apoptosi e caspasi esecutrici (caspasi -3,-6,-7) responsabili della fase effettrice del processo apoptotico [21].

Ciò nonostante, le caspasi svolgono anche un ruolo in diversi processi cellulari non-apoptotici come la regolazione del ciclo, differenziamento e proliferazione cellulare [18-27-28].

Nel differenziamento, le caspasi-3,-8 regolano i processi di formazione degli eritrociti, delle piastrine e il differenziamento dei monociti [29]. Le caspasi sono attivate in risposta a specifici fattori di crescita; l'azione di queste proteasi su proteine bersaglio conduce all'attivazione di fattori trascrizionali coinvolti nella regolazione di specifici geni [30].

Alcuni studi, condotti su pazienti con deficienza nell'espressione di caspasi-8, hanno evidenziato un'associazione di tale deficit con un difetto nel controllo dell'attivazione-proliferazione dei linfociti T, B e delle cellule NK; secondo questi studi, fattori trascrizionali (NF-kB, NFAT), attivati dall'azione catalitica delle caspasi, regolano l'espressione di molecole di superficie (CD25) e la produzione di citochine come la IL-2 [25-26-31]. Il difetto genetico di caspasi-8 infatti porta alla riduzione del rilascio di IL-2 e dell'espressione di CD25 e allo sviluppo di una grave immunodeficienza [25-27].

Il difetto nell'attivazione dei linfociti T, B e NK suggerisce un'azione comune della caspasi-8 nelle vie di trasduzione del segnale attivatorio dei linfociti [25], alti livelli di caspasi attivate condurrebbero all'apoptosi, mentre limitati livelli sosterebbero l'attivazione cellulare [27-32].

Nella regolazione del ciclo cellulare dei linfociti B, invece, è stata dimostrata la capacità della caspasi-3 di agire su vari inibitori del ciclo cellulare (Wee1, p21^{Waf1}, p27^{KIP1}) che, sottoposti all'azione delle proteasi, non sono più in grado di inattivare le chinasi regolatorie Cdc favorendo la progressione dei linfociti B nelle fasi del ciclo cellulare [27-28-32-33].

Un altro modello ipotizza il coinvolgimento di FADD e caspasi-8 nel controllo della progressione del ciclo cellulare. Durante la mitosi, FADD (fosforilato sulla serina194 nella fase G2/M) si associa a caspasi-8 o a con altre proteine mitotiche (MDP, mitotic DISC-forming protein) formando un complesso in grado di portare alla maturazione di proteine coinvolte nella progressione del ciclo cellulare [34].

Le funzioni non-apoptotiche delle caspasi implicano che le cellule possano restringere l'attività proteolitica di queste proteasi su specifici substrati e la de-regolazione di queste differenti vie funzionali potrebbe essere coinvolta nello sviluppo di molte malattie umane. Rimane da chiarire come l'attività proteolitica delle caspasi su specifici substrati possa essere ristretta all'interno delle cellule; è stato proposto che un ruolo possa essere svolto dal controllo della loro compartimentalizzazione fisica e funzionale attraverso il coinvolgimento di proteine scaffold e di fattori anti-apoptotici in grado di controllarne l'attivazione in distinti compartimenti cellulari [35].

Inibitori della trasduzione del segnale

La sensibilità all'apoptosi da parte dei linfociti T non solo correla con l'espressione di Fas, ma dipende anche dalla regolazione di proteine anti-apoptotiche. Infatti, il processo apoptotico è controllato da tre famiglie di inibitori che agiscono a diversi livelli della cascata: cFLIP, la famiglia di Bcl-2 e la famiglia delle IAP.

La molecola cFLIP è la variante mammifera dell'inibitore virale vFLIP, coinvolto nella inibizione dell'apoptosi messa in atto da vari agenti virali. cFLIP presenta una struttura molecolare che lo rende altamente omologo alla caspasi-8, ma è privo di attività enzimatica. Esso è quindi in grado di associarsi al complesso Fas/FADD formando una struttura simile al DISC, ma inattiva. In questo

modo FLIP compete con la caspasi-8 nel suo legame con FADD in modo dipendente dai livelli relativi delle due molecole impedendo, quindi, la trasduzione del segnale apoptotico [36].

La famiglia di Bcl-2 comprende differenti membri con attività pro-apoptotica (Bax, Bak, Bcl-xS, Bid, Bim) e anti-apoptotica (Bcl-2, Bcl-xL) che mostrano tre regioni di omologia dette regioni BH (Bcl-2 homology regions) [37]. Queste proteine interagiscono con molecole della stessa famiglia formando omodimeri (es. Bcl-2/Bcl-2) oppure eterodimeri (Bcl-2/Bax), il che regola l'attività pro o anti-apoptotica di queste molecole [38]; tali proteine svolgono un ruolo modulatore della via intrinseca della morte cellulare, modulando il rilascio del citocromo-C [39].

Le proteine della famiglia delle IAP (c-IAP1, c-IAP2, XIAP, N-IAP, Survivina) contengono da una a tre copie del dominio BIR (Baculoviral IAP repeat) costituito da 80 residui di zinco e agiscono inattivando le caspasi mediante un meccanismo di associazione/sequestro [40]; l'estremità carbossi-terminale è costituita dal dominio detto RING finger (Really Interesting New Gene), coinvolto nell'ubiquitinazione delle proteine, mentre un dominio CARD (Caspase Recruitment Domain) è tipico delle molecole c-IAP1 e c-IAP2 [41]. Le proteine che appartengono alla famiglia delle IAP sono considerate multifunzionali per la capacità di inattivare sia caspasi iniziatrici sia quelle esecutrici. Ad esempio XIAP è in grado di esercitare un effetto inibitorio sulla caspasi-9 mentre altre IAP sono in grado di inattivare le caspasi-3 e -7 legandosi al loro sito attivo delle caspasi e impedendone l'interazione con il substrato.

La survivina è una IAP particolare che è implicata nella citoprotezione durante il fenomeno apoptotico: essa forma con XIAP un complesso IAP-IAP promovendone la stabilità e incrementando l'attività inibitoria nei confronti di caspasi-9 [42].

XIAP

Tra le molecole appartenenti alla famiglia delle IAP, la più studiata è XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein); la proteina, costituita da 497 amminoacidi, è codificata da un gene costituito da 7 esoni localizzato sul braccio lungo del cromosoma X (Xq25) [43].

Un sinonimo di XIAP è BIRC4 (Baculoviral IAP Repeat Containing 4), che sottolinea il fatto che la proteina è stata descritta per la prima volta nei Baculovirus dove agisce bloccando l'apoptosi delle cellule infettate da questi virus indotta dai linfociti citotossici. XIAP è ubiquitariamente espresso in tutti i tessuti [44].

XIAP contiene le sequenze BIR, localizzate nella porzione aminotermine, e RING nella regione carbossi-terminale (Figura 2).



Figura 2

Diagramma della proteina XIAP

Il diagramma mostra i quattro domini della proteina XIAP: tre domini BIR e un dominio RING.

La regione che fa da linker tra il BIR1 e il BIR2 è importante per il legame con caspasi-3 e -7 e la loro inattivazione [45]. Viceversa, l'inattivazione della caspasi-9 richiede un legame specifico della forma attiva di questa caspasi-9 con il dominio BIR3, attraverso una tasca idrofobica di BIR3 che interagisce con quattro aminoacidi della subunità p12 della caspasi-9 attivata; questa interazione coinvolge in particolare il residuo W310 di BIR3 [46-47]. XIAP è l'unica IAP in grado di bloccare la caspasi-9 proprio perché contiene il BIR3 responsabile del legame [47].

L'attività antiapoptotica di XIAP può essere contrastata da due proteine mitocondriali SMAC/DIABLO e Omi/HtrA2 [48]. Queste molecole vengono rilasciate nel citoplasma da parte del mitocondrio durante l'apoptosi e si legano a XIAP a livello della tasca idrofobica di BIR3 (la stessa di caspasi-9); questo rende il legame delle tre molecole con XIAP mutualmente esclusivo [46-49].

La funzione dei diversi domini di XIAP non sono ancora chiari: tuttavia, la proteina tronca, contenente solo il dominio BIR1, non è in grado di interagire con le caspasi esecutrici e, di conseguenza, non può inattivare l'apoptosi indotta da Fas. Il dominio RING sembra conferire un'attività E3-ligasica e promuovere l'auto-degradazione di XIAP; inoltre determina la degradazione proteasomica di una molecola-bersaglio quale caspasi-3 e di una molecola modulatrice come Smac [50].

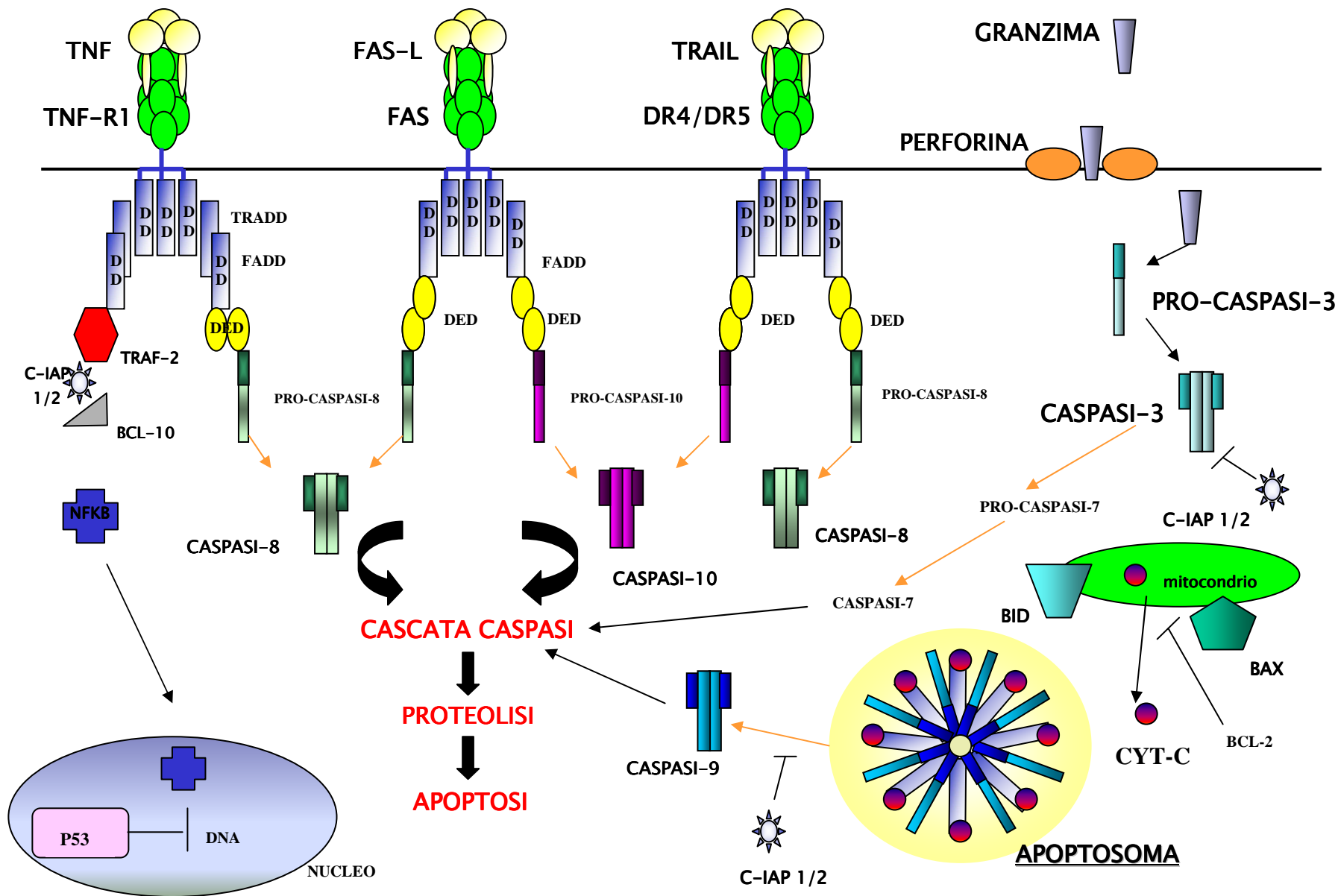


Figura 3

Rappresentazione della via estrinseca e intrinseca dell'apoptosi

La "via estrinseca" è attivata direttamente dalla caspasi-8 a seguito del legame di FasL, TNF, TRAIL con i rispettivi recettori.

La "via intrinseca" coinvolge l'induzione di alterazioni mitocondriali che causano l'attivazione della caspasi-9.

Secrezione dei granuli citotossici

Un aspetto fondamentale del sistema immunitario è la capacità di eliminare le cellule tumorali o infettate da virus grazie all'azione di linfociti CTL e cellule NK.

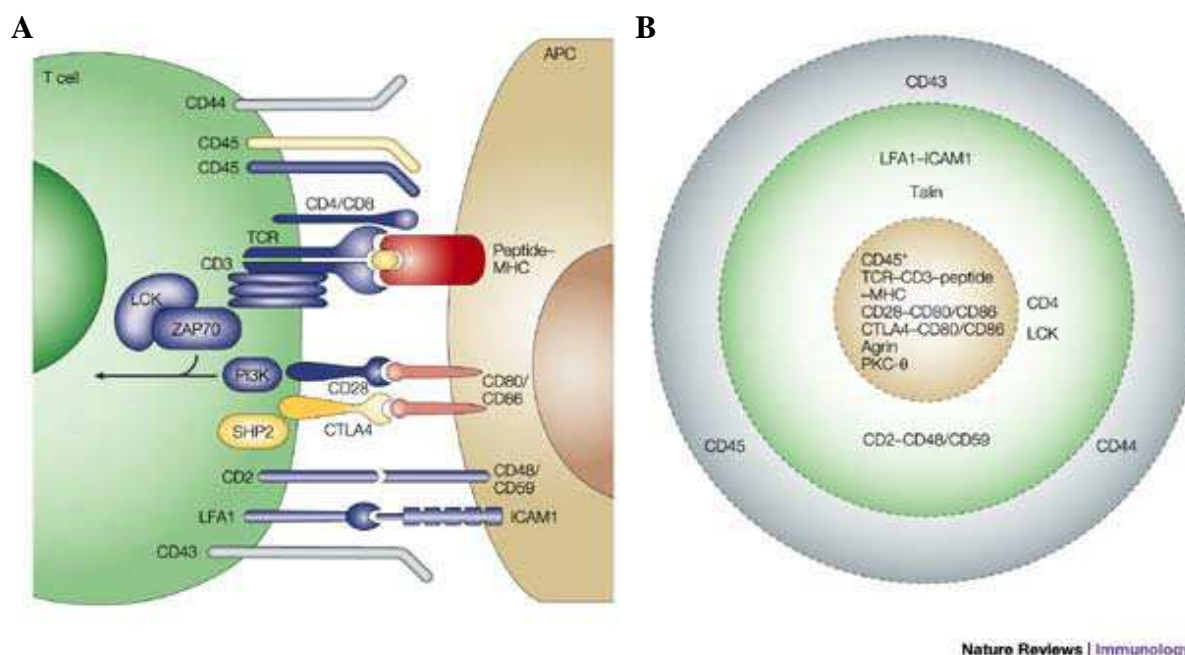
Come descritto in precedenza, l'apoptosi può essere innescata attraverso vari meccanismi come ad esempio la liberazione di perforina e granzimi contenuti nei granuli citotossici.

I linfociti CD8⁺ T vergini, dopo aver riconosciuto l'antigene, richiedono 5-8 giorni per proliferare, differenziare in linfociti CTL e migrare verso le cellule bersaglio. Durante il differenziamento, granzimi e perforina sono sintetizzati e accumulati all'interno dei granuli citotossici. In seguito, i linfociti CTL riconoscono e legano la cellula bersaglio e qui la uccidono in 20-30 minuti inducendone l'apoptosi.

Il legame del linfocita CTL alla cellula bersaglio conduce ad una riorganizzazione dei recettori di superficie, di proteine di segnale intracellulare e di proteine del citoscheletro; questo processo conduce alla formazione di una struttura chiamata *sinapsi immunologica*.

La formazione della sinapsi immunologica è caratterizzata da quattro fasi: 1) riconoscimento della cellula bersaglio, 2) adesione e formazione di una sinapsi tra le due cellule, 3) orientamento del complesso del Golgi e del centro di organizzazione microtubulare (MTOC) del linfocita CTL e 4) polarizzazione dei granuli litici verso la cellula bersaglio [51].

Il riconoscimento della cellula bersaglio avviene attraverso una interazione tra il TCR e il complesso MHC⁺-peptide della cellula bersaglio (Figura 4A); questo legame determina la trasmissione di un segnale che porta ad un riarrangiamento delle molecole di membrana con la formazione di tre aree concentriche: 1) cSMAC (central supramolecular activation complex) ricca di TCR, MHC⁺-peptide, recettori accessori CD4/CD8/CD28, Lck, proteina chinasi C- θ (PKC- θ); 2) pSMAC (peripheral supramolecular activation complex) costituita da un anello ricco di integrine (ICAM) e proteine di membrana associate al citoscheletro; 3) d-SMAC (distal supramolecular activation complex) costituita da molecole come CD43, CD44 e CD45 (Figura 4B).



Nature Reviews | Immunology

Figura 4
Rappresentazione della Sinapsi Immunologica

A) Rappresentazione di alcune delle proteine coinvolte nel riconoscimento antigenico. Le molecole attivanti sono mostrate in blu, quelle inibitorie in giallo e quelle che non contribuiscono alla trasmissione del segnale in grigio. La freccia indica il segnale che converge all'attivazione del linfocita T. **B)** Rappresentazione delle regioni in cui è organizzata la sinapsi immunologica: dal centro cSMAC, pSMAC e dSMAC [52].

I linfociti CTL orientano il MTOC verso il sito di contatto permettendo ai granuli citotossici, ancorati ai microtubuli, di migrare verso la sinapsi immunologica. I granuli sono organelli impiegati da molte cellule per mediare la secrezione di diverse sostanze. Ad esempio, oltre ai linfociti CTL che secernono granzimi e perforina, le mastcellule rilasciano istamina e serotonina, mentre i basofili rilasciano istamina e altre sostanze [53-54-55-56-57].

I granuli presentano una struttura multi-vescicolare che ha origine dalla progressiva invaginazione della membrana plasmatica di endosomi primari; questi ultimi, in seguito, maturano in endosomi tardivi. La presenza di uno stimolo di attivazione conduce alla maturazione dei granuli litici mediante l'unione di lisosomi ed endosomi tardivi [51].

Il trasporto dei granuli citotossici alla sinapsi immunologica è dipendente dal complesso dei microtubuli presenti nel citoscheletro. I granuli si spostano lungo i microtubuli del MTOC, orientato verso il sito di contatto tra linfocita CTL e cellula bersaglio, fino al pSMAC. L'attivazione di proteine segnale, in seguito alla stimolazione del recettore TCR, è fondamentale per l'attivazione della fosfolipasi-C γ (PLC γ) che permette l'orientamento del MTOC e il movimento dei granuli

secretori verso la sinapsi immunologica [51]. La produzione di Inositolo-1,4,5-trifosfato (IP₃) da parte della PLC γ conduce alla fuoriuscita di calcio (Ca²⁺) intracellulare verso il citoplasma. La polarizzazione del MTOC è mediato dal diacilglicerolo (DAG) in maniera Ca²⁺-indipendente mentre il movimento dei granuli è mediata dal Ca²⁺.

In seguito, i granuli si spostano dal pSMAC verso il cSMAC e rilasciano quindi il loro contenuto nella sinapsi. La perforina rilasciata polimerizza sulla superficie della cellula bersaglio portando alla formazione di pori che permettono l'entrata dei granzimi nel citoplasma della cellula bersaglio; i granzimi agiscono quindi sulle caspasi e iniziano la morte per apoptosi della cellula bersaglio.

Come descritto, la *sinapsi immunologica* determina il riarrangiamento delle molecole di membrana dei linfociti CTL e la polarizzazione dei granuli citotossici. Recentemente, uno studio ha riportato che la maturazione e l'adesione alla membrana plasmatica dei granuli coinvolgono le proteine della famiglia Rab GTPasi e della famiglia Munc13 [58].

Proteine Rab

Le proteine Rab GTPasi sono coinvolte nella regolazione della formazione, motilità e fusione delle vescicole alla membrana plasmatica.

Le Rab GTPasi appartengono alla grande famiglia delle piccole GTPasi all'interno della superfamiglia Ras. Le proteine Rab possono essere legate a GTP e alla membrana (stato attivo) o a GDP e trovarsi nel citoplasma (stato inattivo). Il passaggio ciclico tra stato attivo/inattivo è controllato da enzimi regolatori GEF (nucleotide exchange factor) e GAP (GTPase-activating protein) [56-59].

Il numero delle isoforme di Rab varia tra specie e specie; nell'uomo e nel topo esistono 60 diverse isoforme. Il numero elevato di isoforme ha causato molti problemi nell'individuare le isoforme specifiche coinvolte nelle fasi del trasporto vescicolare [60].

La proteina Rab3 è stata la prima isoforma di Rab ad essere associata al processo di regolazione di esocitosi dei granuli nelle cellule neuronali ed endocrine [59]. Recentemente, studi di proteomica hanno evidenziato sulle membrane delle vescicole secretorie la presenza di un'altra isoforma di Rab (Rab27) coinvolta in questo processo [56-61].

Varie forme di Rab sono presenti sulla membrana delle vescicole; tuttavia, la maggior parte di esse sono associate a vescicole immature provenienti dall'apparato di Golgi o dagli endosomi e non sono coinvolte nel processo di esocitosi [60]. Le diverse proteine Rab hanno una distinta distribuzione cellulare che può permettere di identificare l'organizzazione di membrana e le caratteristiche delle

vescicole [60]. Per esempio, Rab4 e Rab5 sono localizzate sugli endosomi primari, Rab7 sugli endosomi tardivi [60].

Le proteine Rab26 e Rab37 sono espresse sulle vescicole di cellule tessuto-specifiche (Rab26 nelle cellule della parotide, Rab37 nelle cellule pancreatiche e nei mastociti); le sottofamiglie Rab3 e Rab27 sono espresse sulla membrana delle vescicole di cellule neuronali, cellule endocrine/esocrine e cellule del sistema immunitario (linfociti CTL, cellule NK e mastociti) [57-59]. In particolare, Rab3a e Rab27a sono coinvolte nel controllo della fase di ancoraggio delle vescicole alla membrana plasmatica piuttosto che nella fase di fusione [56]. Rab27a regola l'esocitosi dei granuli basofili nei mastociti, dei granuli citotossici nei linfociti CTL e dei granuli densi nelle piastrine [61].

Uno studio ha mostrato che il silenziamento della proteina Rab3a (o Rab27a) riduce il numero di vescicole ancorate alla membrana plasmatica e la forma attiva Rab27a (o Rab3a) non è in grado di compensare la funzione della proteina mancante. Il silenziamento di entrambe le isoforme conduce ad una maggiore riduzione di vescicole rispetto al singolo silenziamento il che suggerisce una cooperazione di Rab3a e Rab27a nel processo di esocitosi [56-57].

Le proteine Rab3a e Rab27a possono essere co-espresse sulle membrane delle vescicole delle cellule neuronali, cellule β del pancreas, melanociti e svolgere una differente funzione sul processo di secrezione [55]. Alcuni studi hanno mostrato che la maggiore espressione di Rab3a e Rab27a in varie linee cellulari inibisce il processo di secrezione sebbene le proteine Rab siano promotori positivi del trasporto vescicolare [57-62].

L'azione delle proteine Rab e delle loro proteine effettrici è importante per il processo di fusione delle vescicole alla membrana plasmatica. Questo processo richiede la presenza di altre proteine appartenenti alla famiglia delle proteine SNARE (N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) [63].

L'interazione di una proteina SNARE espressa sulla membrana delle vescicole (v-SNARE) con una proteina SNARE espressa sulla membrana plasmatica (t-SNARE, comprende una catena leggera e due catene leggere) porta alla formazione di un complesso trans-SNARE. Il complesso è costituito da un fascio di quattro eliche (una elica v-SNARE e tre t-SNARE) che interagiscono in modo idrofobico [62]. In seguito alla fusione (mediata dalla proteina Rab e SNARE) delle vescicole con la membrana plasmatica, il complesso trans-SNARE diventa cis-SNARE con la separazione delle proteine v-SNARE e t-SNARE. Questa separazione è promossa dall'azione dei fattori NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) e α -SNAP (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein) [42].

Le proteine VAMP sono le principali proteine v-SNARE coinvolte nel processo di fusione delle vescicole. Esistono sette forme diverse, tra cui VAMP7 (espressa su endosomi tardivi e lisosomi) è importante durante il processo di esocitosi dei granuli litici [62].

I membri della sottofamiglia SNAP (SNAP23, SNAP25, SNAP29: synaptosome-associated protein) sono catene leggere di t-SNARE; la famiglia delle proteine Sintaxina sono catene pesanti di t-SNARE [56-62].

Proteine effettrici della fusione

La fusione delle vescicole secretorie con la membrana plasmatica dipende dall'azione di numerose proteine effettrici. Le proteine Rab3a e Rab27a regolano la fase di ancoraggio delle vescicole alla membrana plasmatica. Tuttavia, la cooperazione delle proteine Rab è promossa da proteine effettrici in grado di interagire sia con Rab3a che con Rab27a.

Esse si dividono nella famiglia delle Slp (synaptotagmin-like proteins) e nella famiglia delle Slac2 (Slp homologue lacking C2-domains).

Tutti i membri di queste famiglie condividono una regione amino-terminale con un dominio SHD (Slp-homology domain) che interagisce direttamente con Rab27a nella sua forma attiva.

Le proteine esofiline (exocytosis-associated rabphilin3/granophilin-like proteins) e Noc-2, individuate come molecole effettrici per Rab3a, possono legare Rab27a; Slp e Slac2 effettori per Rab27a, interagiscono con Rab3a [38-64].

Tutte le molecole effettrici che legano Rab3/Rab27 presentano, all'N-terminale, un dominio RBD (Rab-binding domain) con ripetizioni di residui di zinco e cisteine [64].

Al C-terminale le proteine effettrici hanno due domini C₂ che permettono il legame con i fosfolipidi di membrana durante le fasi del processo di secrezione [64].

Le proteine effettrici legano contemporaneamente le proteine Rab sulla vescicola secretoria e le proteine della membrana plasmatica favorendo la fase di ancoraggio [56].

Slp4 (granofilina)

La proteina effettrice Slp4 presenta due domini C₂ ed è espressa nelle cellule β del pancreas.

Slp4 interagisce, mediante il dominio RBD, con Rab27a e Rab3a [64]. Durante il processo di esocitosi, Slp4 lega Rab27a presente sui granuli secretori e favorisce il legame alla membrana plasmatica attraverso l'interazione con syntaxina-1 (componente delle proteine SNARE di membrana) e Munc18-1 in membrana [64].

Slac2 (melanofilina), rabfilina3

Le proteine Slac2 e rabfilina3 prendono il nome di melanofiline in quanto proteine effettrici espresse nei melanociti.

Le proteine presentano il dominio RBD per Rab27a/Rab3a all'N-terminale, ma nessun dominio C₂ al C-terminale che invece presenta un dominio "coil" in grado di interagire con la miosina-Va [64].

Le melanofiline legano Rab27a sui melanosomi e la miosina-Va sui filamenti di actina portando alla formazione di un complesso proteico che sarà trasportato ai cheratinociti adiacenti [64].

Alcuni studi hanno mostrato che la maggiore espressione degli effettori di Rab3a o Rab27a può modulare il processo di esocitosi nelle cellule endocrine; l'aumento di espressione di Slp4 e Slac2 può inibire l'esocitosi delle vescicole mentre altri membri della famiglia di Slp promuovono la fuoriuscita del contenuto delle vescicole [65-66].

Recentemente, alcuni studi hanno identificato la proteina Munc13-4 come ulteriore effettore della proteina Rab27a [53-57-61].

Munc13-4

Le proteine Munc13 regolano, durante il processo di esocitosi, la formazione di un complesso proteico (complesso trans-SNARE) tra la membrana delle vescicole secretorie e la membrana plasmatica. La famiglia delle proteine Munc13 è composta da tre proteine (Munc13-1, Munc13-2, Munc13-3) con omologia alla proteina Unc-13p di *Caenorhabditis elegans*.

Queste proteine contengono un dominio C1 (capace di legare l'estere del forbolo), due domini C2 (capace di legare calcio e fosfolipidi) e due domini MHD (Munc13-homology-domains) [53].

L'isoforma Munc13-2 è espressa in modo ubiquitario nell'organismo mentre le altre proteine della famiglia Munc13 sono espresse soltanto nel cervello. Munc13-1 è presente in tutti i neuroni e svolge un ruolo nell'attivazione dell'esocitosi delle vescicole sinaptiche, Munc13-3 è espresso nelle regione del cervelletto e controlla il rilascio dei neurotrasmettitori [67].

Per molti anni sono state ricercate proteine, simili alle proteine Munc13, coinvolte nella regolazione dei processi secretori in cellule di tipo non-neuronale. Uno studio [53] ha identificato e caratterizzato una molecola (Munc13-4) appartenente alla sottofamiglia delle molecole Munc13.

Il gene *UNC13D* presente sul tratto cromosomico 17q25 è lungo 17 kb (32 esoni) codifica per la proteina Munc13-4 costituita da 1088 aminoacidi.

La proteina è formata da due domini MHD e C2 ma non presenta il dominio C1 (Figura 5):

i due domini MHD (Munc13 Homology Domains, F⁵⁵⁷-I⁶⁷⁷ per MHD1 e E⁷⁸⁸-K⁸⁹⁴ per MHD2) sono costituiti da α -eliche con lunghezze e ripetizioni aminoacidiche diverse. Questi domini sono essenziali per la localizzazione specifica della proteina [53]

i due domini C2 (P¹⁰⁹-H²⁸⁴ per C2A e A⁹⁰⁴-P¹⁰⁴⁷ per C2B) contengono cinque residui di acido aspartico che formano un sito per gli ioni Ca²⁺ che mediano il legame con i fosfolipidi di membrana

dipendenti dal calcio. La presenza di una α -elica nel loop-3 del dominio C2A, invece, permette il legame con la membrana plasmatica senza la presenza del calcio [53]

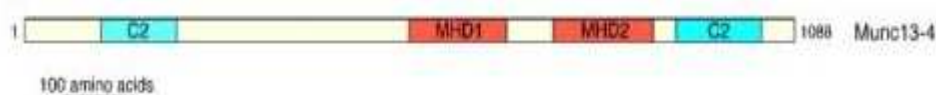


Figura 5

Diagramma della proteina effettrice Munc13-4

Il diagramma mostra i quattro domini della proteina Munc13-4: due domini MHD e due domini C2.

La proteina Munc13-4 è espressa, soprattutto, nelle cellule del tessuto bronchiale, nella milza, nelle cellule dell'apparato riproduttore e nei linfociti CTL; in forma minore nel tessuto muscolare cardiaco, fegato, rene, cervello e muscolo scheletrico [53-57]. Oltre ai linfociti CTL, Munc13-4 è presente anche in altre cellule ematopoietiche come piastrine, mastcellule e cellule NK. In particolare, nelle piastrine, Munc13-4 è distribuita tra citoplasma e membrana plasmatica ma non è associata con i granuli densi [54]; nei mastociti, Munc13-4 è espressa sulla membrana dei lisosomi [68]; nelle cellule NK è espressa sulla membrana dei granuli litici [62].

Munc13-4 conferisce alle vescicole ancorate alla membrana plasmatica uno stato competente alla fusione necessario prima del processo di secrezione [58].

Munc13-4 interagisce con la proteina Rab27a/GTP formando un complesso che agisce durante la fase di fusione vescicola-membrana plasmatica [57]. La regione compresa tra gli aminoacidi D²⁴⁰-V⁵⁴³ è necessaria per il legame con la proteina Rab27a [57].

La proteina Munc13-4 è importante nella regolazione della secrezione del contenuto dei granuli citotossici, ma non è coinvolta nei processi di secrezione citochinica da parte dei linfociti [57].

La proteina è coinvolta, anche, nella secrezione dei lisosomi nei mastociti e dei granuli densi nelle piastrine [53-57].

Uno studio ha descritto la capacità della proteina Munc13-4 di favorire l'associazione di endosomi di riciclo (che esprimono Rab11) con endosomi tardivi (che esprimono Rab7 e Rab27a) per formare vescicole dette esocitiche. Queste vescicole, in seguito ad uno stimolo di attivazione, si uniscono a lisosomi e portano alla formazione di granuli litici maturi [51-58]. Questo modello è in contrasto con uno studio che afferma l'associazione costitutiva di Rab27a e Munc13-4 sulle membrana dei lisosomi [58].

Il processo di secrezione

Il processo di secrezione del contenuto delle vescicole è costituito da diverse fasi: reclutamento delle vescicole secretorie verso la sinapsi immunologica e ancoraggio alla membrana plasmatica, attivazione e fusione delle vescicole, secrezione del contenuto delle vescicole.

Le Rab GTPasi sono i regolatori principali della formazione, motilità e fusione delle vescicole. In seguito ad una stimolo di attivazione (esempio il legame del TCR con il complesso MHC⁺-peptide), i lisosomi uniti a endosomi tardivi portano alla formazione di granuli litici maturi che polarizzano verso la sinapsi immunologica (Figura 6) [51]. Lo stimolo di attivazione permette il passaggio dalla forma inattiva RabGDP alla forma attiva RabGTP promosso dal fattore GEF [59-60]. RabGTP interagisce con specifiche proteine effettrici che permettono il legame con le proteine della membrana plasmatica (fase di ancoraggio). Per esempio, nei linfociti CTL la proteina Rab27aGTP lega la proteina effettrice Slp1/2 che permette il legame con le proteine di membrana SNAP23 [51-60]. Dopo l'ancoraggio dei granuli alla membrana plasmatica, una ulteriore fase (attivazione) è necessaria per rendere le vescicole competenti alla fusione con la membrana plasmatica.

La proteina Munc13-4 è coinvolta in questa fase. Munc13-4 lega il complesso syntaxina-11/Munc18-2 sulla membrana plasmatica e ne promuove il passaggio alla conformazione attiva. Questo cambiamento promuove la formazione di una struttura a fascio composta da RabGTP/Slp2_t-SNARE (SNAP23, syntaxina-11/Munc18-2)_v-SNARE (VAMP7) [51].

Il complesso syntaxina-11/Munc18-2, probabilmente, regola l'ancoraggio dei granuli e la formazione iniziale del complesso SNARE prima dell'inizio della fase di attivazione [51].

In seguito alla fusione dei granuli alla membrana plasmatica, i granuli liberano il loro contenuto (Figura 6). Un ruolo importante è svolto dalla sfingomielinasi acida (ASMasi) che permette il movimento dei lipidi di membrana e la conseguente esocitosi del contenuto dei granuli.

Le proteine della famiglia Rab27, Munc13, SNARE sono coinvolte nel processo di esocitosi dei granuli litici nei linfociti CTL; questo suggerisce un modello applicabile al trasporto vescicolare in altri tipi cellulari [54-57-61].

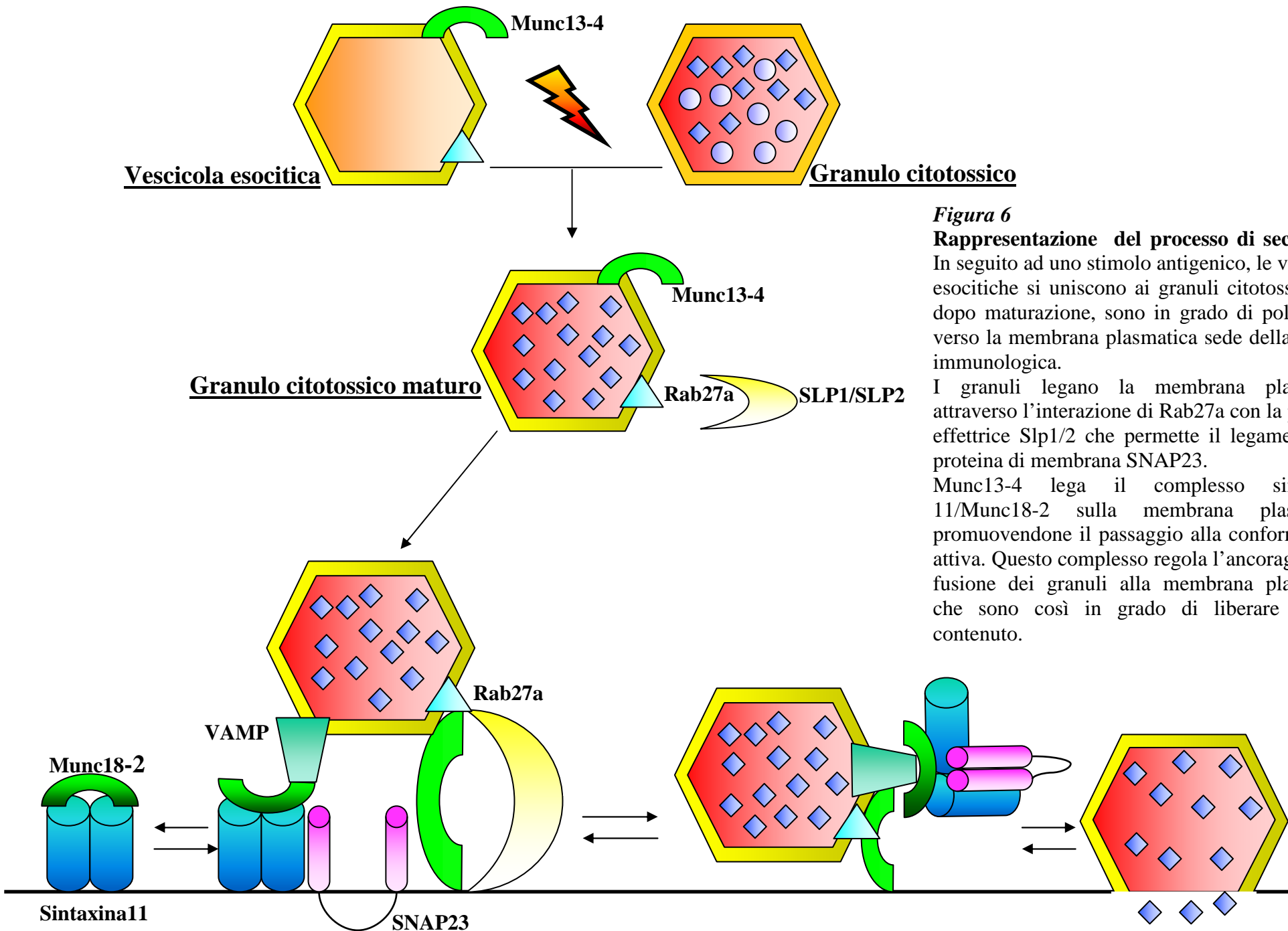


Figura 6

Rappresentazione del processo di secrezione

In seguito ad uno stimolo antigenico, le vescicole esocitiche si uniscono ai granuli citotossici che, dopo maturazione, sono in grado di polarizzare verso la membrana plasmatica sede della sinapsi immunologica.

I granuli legano la membrana plasmatica attraverso l'interazione di Rab27a con la proteina effettrice Slp1/2 che permette il legame con la proteina di membrana SNAP23.

Munc13-4 lega il complesso syntaxina-11/Munc18-2 sulla membrana plasmatica, promuovendone il passaggio alla conformazione attiva. Questo complesso regola l'ancoraggio e la fusione dei granuli alla membrana plasmatica che sono così in grado di liberare il loro contenuto.

Il signaling nell'attivazione dei linfociti T

Come descritto in precedenza, la formazione della sinapsi immunologica avviene in seguito all'interazione tra il TCR e il complesso MHC⁺-peptide della cellula bersaglio. Questa rappresenta una struttura complessa che comporta il riarrangiamento delle molecole di membrana e la trasduzione di diversi segnali cellulari che conducono all'espressione di diversi antigeni di superficie [4].

La sinapsi immunologica è una struttura altamente dinamica, caratterizzata da segregazione di proteine e lipidi, compartimentalizzazione del segnale e scambio bidirezionale di informazioni, tramite immuno-trasmittitori sia solubili che legati alla membrana.

Tramite l'organizzazione temporale e spaziale del TCR, delle molecole ad esso associate, delle altre proteine transmembrana e dei secondi messaggeri in *clusters* attivanti e in un complesso sopramolecolare che può essere dinamicamente montato e smontato, la sinapsi immunologica gioca un ruolo chiave nell'iniziare, integrare, modulare, amplificare e sostenere gli importanti segnali forniti da diversi sistemi recettoriali [52]. La natura compartimentalizzata e polarizzata della sinapsi immunologica facilita un *signaling* locale, che porta a specifiche risposte cellulari in tempi e luoghi specifici. Per esempio, la sinapsi immunologica permette a recettori a bassa affinità per il ligando, come CD28 e CD40 [69] di trovarsi in un ambiente protetto in cui l'associazione è più probabile e il legame può avvenire ripetutamente.

L'inizio e il mantenimento dell'attivazione dei linfociti T dipendono da molecole per la trasduzione del segnale, alla periferia della sinapsi immunologica [70]. Alcune di queste molecole sono ad esempio Lck, Zap70, LAT (adattatore per l'attivazione dei linfociti T) e SLP-76 (proteina contenente il dominio SH2) che mostrano eventi di fosforilazione su tirosina [71].

Il TCR è incapace di trasdurre un segnale dopo aver legato l'antigene, a causa della corta coda intracitoplasmatica. Alla trasduzione del segnale è quindi deputato il complesso CD3 che presenta domini intracitoplasmatici dotati di sequenze importanti per la trasduzione del segnale, denominati ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs). In seguito al legame dell'antigene con il TCR avviene la fosforilazione dei residui tirosinici degli ITAMs da parte di chinasi della famiglia Src, come Lck e Fyn; le Src-chinasi iniziano la trasduzione del segnale, pur non essendo molecole recettoriali, per la loro capacità di associarsi non covalentemente ma costitutivamente alla coda citoplasmatica di CD4 e CD8 [72].

Il punto di arrivo della cascata di traduzione del segnale è rappresentato dall'attivazione di fattori di trascrizione in grado di legare il DNA a livello di bersagli genetici importanti per la maturazione e sopravvivenza dei linfociti T e per la risposta immunitaria [73].

Una famiglia di recettori che partecipa alla sinapsi immunologica è la famiglia SLAM. Questi vengono reclutati in prossimità del TCR e fosforilati dalle chinasi della famiglia-Src (Fyn e Lck) in domini specifici a seguito della stimolazione con anticorpi agonisti del solo TCR [74].

Recettori SLAM

La famiglia SLAM (Signalling lymphocyte activation molecule) comprende sette recettori transmembrana appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline: SLAM (CD150); 2B4 (CD244), Ly-9 (CD229), NTBA (SLAMF6 o Ly-108 nel topo), CD84 (SLAMF5), CD48 e CRACC (CD2-like receptor activating cytotoxic cells o CD319) [75-76-77].

Tutti questi recettori presentano una porzione extracellulare composta da due domini di tipo immunoglobulinico coinvolti in interazioni omotipiche, un singolo dominio transmembrana e una lunga regione citoplasmatica caratterizzata da tre motivi consensus TI/VYxxV/I denominati ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif); questo dominio è riconosciuto dalle proteine adattatrici come SAP, EAT-2, ERT [78-79-80-81]. Con l'eccezione di 2B4, il cui ligando è CD48, tutti gli altri membri di questa famiglia di recettori sono auto-ligandi e mediano le interazioni cellula-cellula. L'espressione di questi recettori è limitata alla linea ematopoietica e differisce nei vari tipi cellulari; in particolare SLAM è presente nei linfociti T e B attivati, cellule dendritiche, monociti e piastrine [74-78-79-82].

Diversi studi hanno mostrato un coinvolgimento dei recettori della famiglia SLAM nella funzione del sistema immunitario [78-83-84]; i recettori regolano l'attivazione e l'attività citotossicità delle cellule NK e dei linfociti T [76-85-86-87], la formazione delle cellule NKT [76-88], la stimolazione delle cellule T_H2 [78-87-89], lo switch isotipico e il mantenimento delle cellule secernenti anticorpi [90]. In particolare, la molecola SLAM è una molecola co-stimolatoria, il cui segnale modula la secrezione di citochine di tipo T_H1 o T_H2 [80-84]. Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che la stimolazione di SLAM può indurre proliferazione e produzione di IFN- γ anche indipendente dalla stimolazione del TCR [91].

Proteine SAP

I recettori della famiglia SLAM possono associare con le proteine adattatrici appartenenti alla famiglia SAP [78-83-84].

La famiglia delle proteine SAP comprende tre membri: SAP (Slam Associating Protein), EAT2 (Ewing's sarcoma-associated transcript-2) e, nei roditori, ERT (EAT2-related transducer) [78-83-84]. Il gene codificante SAP è localizzato, nell'uomo e nel topo, sul cromosoma X mentre i geni degli altri due membri sono posizionati in tandem sul cromosoma 1 [92].

SAP è espresso dai linfociti T, dalle cellule NK e NKT, eosinofili, piastrine e in alcune popolazioni di linfociti B [83-84]. EAT2, invece, è espresso sulle cellule NK, sulle cellule dendritiche (DC) e sui macrofagi; ERT è presente soltanto sulle cellule NK [87].

SAP è una proteina adattatrice intracitoplasmatica di 15 kDa costituita da un singolo dominio SH2 (Src Homology 2) e due code costituite dall'estremità C-terminale (25 aminoacidi) che presenta due tirosine fosforilabili e dall'estremità N-terminale (5 aminoacidi) [87-93].

Il gene *SH2D1A* (Src Homology 2 Domain 1A containing protein) o *SAP* presente sul tratto cromosomico Xq25-q26 è lungo 25Kb ed è costituito da 4 esoni e 3 introni [94].

La proteina SAP mediante il dominio SH2 è in grado di legare le fosfotirosine sulle code citoplasmatiche (dominio ITMS) dei recettori SLAM [78-83-84-87].

SAP lega questi siti con alta affinità e impedisce l'interazione con tirosine fosfatasi SHP-1/2 (SH2 domain-containing phosphatase-1/2), SHIP-1 (SH2 domain-containing 5' inositol phosphatase) e Csk [78-84-91]; tale meccanismo impedisce l'inibizione dei recettori SLAM e favorisce l'attivazione delle cellule.

SAP è in grado di traslocare in membrana la proteina Fyn (tirosina chinasi della famiglia-Src) attraverso l'interazione dell'arginina-78 (R78), presente nel dominio SH2 sul lato opposto a quello di legame per la fosfotirosina, con il dominio SH3 di Fyn [94-80-87-95]; in EAT-2 questo sito è assente. Questa associazione influenza alcune delle funzioni di SAP [96-97]. Recenti studi hanno suggerito un coinvolgimento di questo segnale nello sviluppo dell'autoimmunità e linfadenopatia in topi *MRL/lpr/lpr*: i linfociti T dei topi *lpr* mostrano una attivazione inusuale di Fyn che potrebbe favorire la loro sopravvivenza [98-99]. La mancanza della proteina Fyn conduce ad una riduzione della linfadenopatia e produzione di autoanticorpi [100].

SAP può associare, grazie al suo dominio SH2, con i tre siti consensus presenti sul recettore SLAM (in particolare il motivo contenente le tirosine 307 e 327 se fosforilate e il motivo contenente la tirosina 281 anche in assenza di fosforilazione) [79-101]. Inoltre, SAP è in grado di legare contemporaneamente la chinasi Fyn. Nel linfocita quiescente è presente, quindi, un complesso stabile SLAM/SAP/Fyn che, in seguito alla stimolazione con anticorpi agonisti, promuove la fosforilazione delle ITSM e il reclutamento di altre molecole (effettore SHIP-1, adattatori Shc, Dok1/2 e scambiatori guaninici RasGAP) [78-80]. Questo complesso multiproteico traduce un segnale che rinforza e modula la produzione di citochine indotta dal segnale generato dal TCR: i segnali intracellulari provenienti dal recettore SLAM e dal TCR si sovrappongono e si rinforzano ampiamente generando un'appropriata risposta immune (Figura 7).

Recentemente, è stato mostrato che in assenza delle proteine adattatrici-SAP, i recettori SLAM perdono non solo la loro funzione di attivazione ma diventano recettori inibitori [85].

Alcuni studi hanno mostrato che i recettori della famiglia SLAM possono svolgere 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, tuttavia, non presenta il dominio per legare Fyn; (ii) in cellule NK di pazienti affetti dalla malattia linfoproliferativa legata al cromosoma X (XLP), privi di SAP, è stato osservato che la stimolazione di 2B4 è in grado di inibire la citotossicità NK; (iii) recettori della famiglia SLAM si associano a proteine come SHP-2 e mediano specifici segnali biochimici come l'attivazione di Akt anche in assenza di SAP [93].

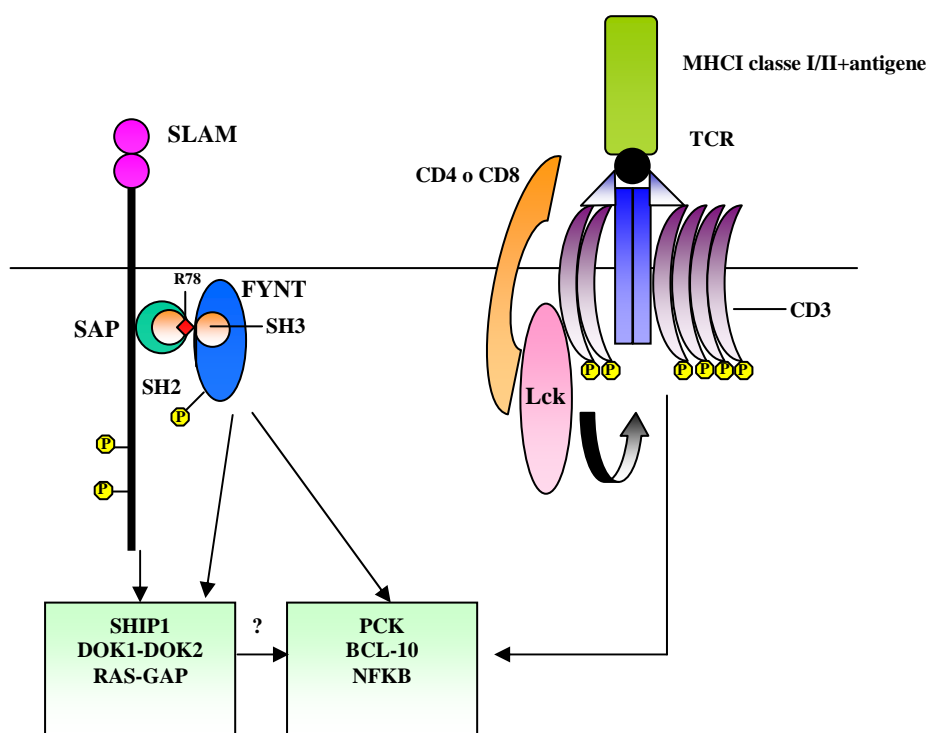


Figura 7

Meccanismo di azione della proteina SAP

La proteina Fyn viene reclutata in membrana mediante l'interazione dell'arginina-78 (R78), presente nel dominio SH2 di SAP, con il dominio SH3 di Fyn. SAP può legare i "siti consensus" presenti sul recettore SLAM grazie al suo dominio SH2. Il complesso stabile SLAM/SAP/Fyn promuove la fosforilazione dei domini intracitoplasmatici (ITSM) conducendo all'attivazione di molecole effettrici che cooperano con i segnali mediati dal TCR. Infatti, il legame TCR/CD4-8 con il complesso MHC⁺-antigene determina l'attivazione dei linfociti T attraverso l'attivazione della proteina Lck che conduce alla fosforilazione delle tirosine presenti sui domini ITAM del TCR.

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% di 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 [80].

La malattia è quasi asintomatica in assenza di infezione da EBV (Epstein Barr Virus); tuttavia, a lungo termine si manifestano linfoproliferazione, disgammaglobulinemia e fenomeni autoimmuni [94]. Tali sintomi sono dovuti ad una perdita della regolazione dei linfociti T-helper e dall'infezione dei linfociti B con EBV che determina linfoproliferazione e danni sistemici [102].

Alcune caratteristiche della XLP possono essere ricondotte ad una ridotta attività citotossica cellulo-mediata dei linfociti T CD8⁺ e delle cellule NK [103]; tuttavia, diversi studi “in vivo” e “in vitro” hanno mostrato difetti nella proliferazione e sintesi di interleuchine. I linfociti di pazienti XLP presentano, 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 [104]. Inoltre, i linfociti CD4⁺ di pazienti XLP mostrano una minore espressione di ICOS e producono una quantità ridotta di IL-10, il che suggerisce che questi deficit possano contribuire al mancato switch isotipico dei linfociti B e dell'ipogammaglobulinemia osservati negli stessi pazienti [78]. Questi dati sono stati confermati in topi Knock-out per SAP che hanno mostrato, anche, deficit di secrezione di IL-4 e aumentata produzione di IFN- γ [95-105].

Mutazioni del gene sono state riscontrate, anche, in pazienti affetti da immunodeficienza comune variabile (CVID) [106-107].

Autoimmunità

L'immunità, ovvero lo stato di protezione dalle malattie infettive, ha componenti sia non specifiche sia specifiche. La componente non specifica, immunità innata, comprende un gruppo di meccanismi di resistenza alle malattie che non sono specifici per un particolare patogeno. Viceversa la componente specifica, immunità acquisita, è caratterizzata da una risposta specifica verso un componente estraneo all'organismo (non-self). La risposta immunitaria specifica coinvolge linfociti T e B attivati da antigeni non-self [1].

L'attivazione dei linfociti stimola l'acquisizione di funzioni effettrici e, successivamente, l'espressione di molecole coinvolte nel processo di spegnimento del sistema immunitario che induce apoptosi dei linfociti effettori. Tuttavia, una piccola parte di linfociti sopravvive andando a costituire un gruppo di linfociti memoria necessari per una risposta immunitaria più rapida e vigorosa ad una nuova esposizione dello stesso antigene [9].

Lo spegnimento della risposta immunitaria è fondamentale per il controllo del numero dei linfociti periferici e per ridurre il rischio di cross-reattività tra antigeni self e non-self [108]. Secondo il modello del “mimetismo molecolare”, le malattie autoimmuni sarebbero dovute ad una cross-reattività tra antigeni non self microbici e antigeni self, a causa della quale una risposta immunitaria

indotta da un patogeno potrebbe cross-reagire contro antigeni tissutali self, anche dopo l'eliminazione del patogeno inducendo un danno autoimmune [108].

Le malattie autoimmuni

Le malattie autoimmuni possono essere classificate in due gruppi a seconda del tessuto bersaglio: malattie organo-specifiche (ad esempio: diabete mellito di tipo-1, Tiroidite di Hashimoto, Anemia Emolitica) e sistemiche (ad esempio: Lupus Eritematoso Sistemico, Sclerodermia, Dermatomiosite) [1]. Le prime sono caratterizzate dalla presenza di autoanticorpi o linfociti T effettori diretti contro antigeni bersagli espressi da un certo organo o tessuto e le sue manifestazioni sono in gran parte a carico di quel particolare organo o tessuto. Le malattie autoimmuni sistemiche, invece, presentano autoanticorpi diretti contro antigeni espressi da un ampio spettro di organi o tessuti e per tale ragione hanno un ampio spettro di manifestazioni cliniche.

Dal punto di vista del meccanismo immunopatogenetico, le malattie autoimmuni possono essere mediate da anticorpi (esempio: Emocitopenie Autoimmuni) oppure da linfociti T (esempio: Diabete mellito di tipo-1, Sclerosi Multipla).

Controllo e cause dell'autoimmunità

Nell'organismo, il mantenimento della tolleranza agli autoantigeni è garantito da tre meccanismi diversi [9]:

- limitazione della reattività da parte dei meccanismi regolatori della tolleranza periferica,
- sequestro degli antigeni self che li rende inaccessibili al sistema immunitario,
- tolleranza centrale dei linfociti T e B agli antigeni.

L'alterazione di questi processi fisiologici può portare all'attivazione di cloni di linfociti autoreattivi e allo sviluppo di reazioni umorali o cellulari contro antigeni self dell'organismo.

In generale, queste risposte sono secondarie alla stimolazione da parte di agenti infettivi (batteri, virus) o ad alterazioni intrinseche delle cellule del sistema immunitario.

Le infezioni possono scatenare la malattia attraverso meccanismi diversi [109]:

- danneggiamento di un tessuto con liberazione di antigeni che non sono mai venuti in contatto con il sistema immunitario (antigeni sequestrati) e che quindi vengono riconosciuto come non-self;
- presenza in virus e batteri di antigeni identici o simili a normali componenti self (mimetismo molecolare) che possono determinare cross-reazione contro il self dopo che l'agente infettivo è stato eliminato;
- innesco di una risposta infiammatoria localizzata con un conseguente aumento della concentrazione di citochine, molecole costimolatorie e molecole MHC di classe II che possono favorire l'attivazione inappropriata di linfociti T autoreattivi (effetto adiuvante).

Questi meccanismi non sono mutualmente esclusivi ma possono presentarsi insieme, determinando il fenomeno conosciuto come “epitope spreading” (espansione epitopica), molto frequente nelle malattie autoimmuni croniche. 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.

Molte malattie autoimmuni presentano un certo grado di familiarità e questo ha indotto molti studi a ricercare i fattori genetici coinvolti nel loro sviluppo. Nel complesso i dati ottenuti disegnano il quadro tipico delle malattie multifattoriali causate dalla combinazione di fattori genetici e di fattori ambientali [110].

Un insieme di geni diversi possono influire nella suscettibilità genetica allo sviluppo della malattia che richiede, comunque, l'induzione da parte di fattori scatenanti (età, sesso, background genetico, esposizione a fattori infettivi e ambientali) [1]. Tra questi geni, i principali sono gli alleli delle molecole MHC di classe II, che possono favorire lo sviluppo di una particolare malattia autoimmune attraverso una efficiente presentazione dei peptidi autoimmuni coinvolti in quella particolare malattia. Tuttavia gli alleli MHC da soli non esauriscono la predisposizione genetica per una certa malattia autoimmune, che richiede invece il contributo di molteplici geni in parte specifici per quella malattia, in parte comuni a più malattie autoimmuni, come oggi messo gradualmente in luce da studi di Genome Wide Analysis (GWA) [111-112].

Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS)

Il processo di spegnimento del sistema immunitario è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi numerica dei linfociti e della tolleranza periferica [6-7]. Il difetto di questo sistema può causare malattie caratterizzate dall'accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari e da autoimmunità.

Alcuni modelli animali sono rappresentativi di questo quadro. I topi *MRL^{lpr/lpr}* (lymphoproliferation) e *MRL^{gld/gld}* (generalized lymphoproliferation disease) sono portatori di mutazioni recessive a carico del gene che codifica rispettivamente Fas e FasL. I topi *MRL^{lpr/lpr}* mostrano linfoproliferazione con linfadenopatia, splenomegalia, espansione policlonale di linfociti T TCR $\alpha\beta^+$ doppi negativi CD4⁻ e CD8⁻ (DNT), che sono i classici marcatori dei linfociti T helper e CTL e manifestazioni autoimmuni; i topi *MRL^{gld/gld}* sono caratterizzati da linfoproliferazione (in assenza di DNT e splenomegalia) e un quadro simile al Lupus Eritematoso Sistemico (LES) [113-114].

Secondo un modello oggi comunemente accettato, questi quadri sarebbero legati alla ridotta efficienza della apoptosi Fas-indotta dei linfociti attivati, cui conseguirebbe un difettoso spegnimento della risposta immunitaria.

Nell'uomo è stata descritta una malattia simile a quella dei topi *MRL^{lpr/lpr}* o *MRL^{gld/gld}* denominata "Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa" (ALPS-OMIM#601859) [114-115]. La malattia si sviluppa in età pediatrica ed è caratterizzata da linfadenopatia e/o splenomegalia, espansione periferica di linfociti DNT, ridotta funzionalità del sistema Fas, manifestazioni autoimmuni (glomerulonefrite, sindrome di Guillian-Barrè, epatite, artrite, vasculite, LES), citopenie e ipergammaglobulinemia. I pazienti in età adulta sono predisposti allo sviluppo di linfomi [114].

La maggior parte dei pazienti con ALPS presentano una mutazione eterozigote nel gene di Fas [113-116], ma alcuni pazienti possono presentare mutazioni in altri geni coinvolti nella funzione di Fas, oppure non presentare mutazioni note, pur in presenza di un difetto funzionale di Fas. Questo ha condotto ad una classificazione genetica che distingue le seguenti forme di ALPS [117-118]:

*ALPS-FAS causata da mutazioni in omozigosi o eterozigosi nel gene di Fas che determinano, rispettivamente, perdita completa o riduzione della funzionalità del recettore Fas [118]; una variante di questa forma è

*ALPS-sFAS in cui la mutazione di Fas è di tipo somatico [119];

*ALPS-FASLG causata da mutazioni nel gene di FasL [113];

*ALPS-CASP10 causata da mutazioni nel gene di caspasi-10 coinvolta nella traduzione del segnale di Fas [116]; infatti nell'uomo l'interazione Fas/FasL porta al reclutamento di caspasi-8 e caspasi-10 per formare il complesso DISC;

*ALPS-U con fenotipo clinico e immunologico tipico dell'ALPS, ma con difetto genetico ancora sconosciuto [13].

Recentemente, oltre alla classificazione molecolare dell'ALPS, sono stati identificati alcuni altri disordini correlati a questa malattia in quanto legati ad altri difetti dell'apoptosi linfocitaria. Appartengono a questo gruppo i seguenti disordini:

1) CEDS (Caspasi-Eight Deficiency State) caratterizzata da linfadenopatia-splenomegalia con modesto aumento dei linfociti DNT, ma soprattutto da grave immunodeficienza a carico dei linfociti T, B e NK [116-118];

2) RALD (RAS-associated autoimmune leukoproliferative disease) causata da mutazioni somatiche a carico del gene di NRAS [120]. Queste mutazioni determinano una maggiore attività della proteina NRAS e una resistenza dei leucociti all'apoptosi da carenza di fattori trofici [115];

3) XLP1 (X-linked lymphoproliferative disease type I) causata da mutazioni a carico del gene di SAP, un trasduttore del segnale di recettori della famiglia SLAM coinvolti nella attivazione di vari tipi di linfociti. Il quadro clinico è caratterizzato da linfoproliferazione e aumentata suscettibilità alle infezioni da virus di EBV [121];

4) DALD (Danzani Autoimmune Lymphoproliferative Disease; OMIM#605233) caratterizzata da un quadro clinico simile all'ALPS in presenza di deficit funzionale di Fas, ma in assenza dell'espansione dei linfociti DNT necessari per la diagnosi di ALPS. I linfociti T dei pazienti con DALD mostrano un difetto funzionale di Fas in assenza di mutazioni a carico dei geni di Fas, FasL e caspasi-10 [9-113-122]. La presenza del difetto anche nei genitori dei pazienti suggerisce che la malattia abbia basi genetiche [123].

Ulteriori disordini linfoproliferativi

La sindrome emofagocitica

La sindrome emofagocitica (HS) è una malattia caratterizzata da infiammazione multi-sistemica, infiltrazione di linfociti CD8⁺T e difetto nel processo di secrezione dei granuli citotossici.

La HS comprende tre differenti condizioni clinico-genetiche:

1) La *sindrome di Griscelli* (OMIM#667624), rara malattia autosomica recessiva, causata da mutazioni nei geni codificanti per la proteina Rab27a (RAB27A) e per la miosina-5a (MYO-VA) [124].

I geni *RAB27A* e *MYO-VA* mappano sulla regione cromosomica 15q21 e codificano per effettori chiave del trasporto vescicolare intracellulare. La sindrome è caratterizzata da ipopigmentazione della cute e dei capelli e dall'accumulo di melanosomi maturi nei melanociti. I pazienti con mutazioni nel gene *RAB27A* associano all'albinismo parziale un difetto dei linfociti CTL e un quadro di linfocitopenia emofagocitica con attivazione incontrollata di macrofagi e linfociti CTL in seguito a infezioni virali.

Il quadro immunologico sarebbe legato alla ridotta capacità dei linfociti citotossici di eliminare le cellule infettate da virus, a cui si cercherebbe di ovviare con una esagerata linfoproliferazione e produzione di IFN- γ , causa di un pericoloso quadro simil-settico legato a una attivazione macrofagica massiva. Al contrario, pazienti con difetti della miosina-Va associano all'ipopigmentazione un deterioramento neurologico primitivo, precoce e grave, senza anomalie immunologiche [124].

2) La *sindrome di Chediak-Higashi* (OMIM#214500), malattia genetica rara a trasmissione autosomica recessiva caratterizzata da albinismo parziale, anomalie neurologiche multiple e granuli citoplasmatici anomali nei neutrofili. La principale manifestazione clinica è la suscettibilità alle infezioni batteriche dovuta alle anomalie dell'attività microbica dei neutrofili e dei monociti. La malattia è causata da una mutazione del gene *LYST* che codifica per una proteina coinvolta nella regolazione del movimento lisosomiale e nella funzione citotossica dei granulociti neutrofili. La

sindrome è caratterizzata dalla comparsa di un quadro linfoproliferativo che può portare al decesso durante la seconda o terza decade di vita.

3) La *linfoistiocitosi emofagocitica familiare* (FHL, OMIM#267700) che è una malattia genetica eterogenea che insorge in genere nel primo anno di vita ed è legata a una ridotta funzione di perforina, che è uno dei principali effettori della citotossicità cellulo-mediata.

La malattia può essere causata da varie alterazioni genetiche. Accanto a una forma, detta di tipo 1 (FHL1) in cui la lesione genetica non è nota, si trova una forma, detta FHL2, in cui la lesione genetica colpisce il gene di perforina (*PRF1*) [125] determinando una alterata produzione della proteina o la produzione di forme inattive. In altri casi la mutazione riguarda, invece, geni coinvolti nel processo di secrezione dei granuli citotossici. Nella FHL3 le mutazioni colpiscono il gene *UNC13D* che codifica la proteina Munc13-4, essenziale per l'attivazione e fusione dei granuli con la membrana [53]. Più raramente la mutazione può colpire i geni di Sintaxina-11 (FHL4) o Munc18-2 (FHL5) [51].

FHL è caratterizzata da febbre, epatosplenomegalia, citopenia e disordini del sistema nervoso centrale. Si osservano, inoltre, bassi livelli di fibrinogeno e alti livelli di ferritina, trigliceridi e della α -catena dell'interleuchina-2 (CD25). L'elemento centrale della malattia è la ridotta capacità dei linfociti citotossici di eliminare le cellule infettate da virus, a cui consegue linfoproliferazione e un quadro di attivazione macrofagica massiva.

Sindrome Linfoproliferativa legata all'X di tipo-2 (XLP2)

XLP2 è dovuta a mutazioni nel gene *BIRC4* codificante XIAP, che causano un deficit nell'espressione di questo inibitore delle caspasi. La carente espressione di XIAP causa una maggiore suscettibilità dei linfociti agli stimoli apoptotici e, per ragioni non note, si associa ad un'assenza di linfociti NKT e ad un'aumentata suscettibilità alle infezioni virali e in particolare da EBV [121].

OBIETTIVO DEL LAVORO

Il lavoro parte dalla osservazione fatta in uno studio precedente che dimostrava che mutazioni eterozigoti a carico del gene di perforina, responsabili dello sviluppo di FHL in doppia eterozigosi, possono agire da fattori predisponenti per lo sviluppo di ALPS e DALD in soggetti portatori di difetti funzionali a carico di Fas. Obiettivo del lavoro presentato in questa tesi era l'estensione di questa osservazione valutando in modo sistematico il grado di sovrapposizione genetica tra ALPS o DALD e altre malattie ereditarie caratterizzate da linfoproliferazione; in particolare sono state ricercate in pazienti con ALPS o DALD mutazioni a carico dei geni di Munc13-4 e syntaxina-11, coinvolti nella FHL, e di XIAP e SAP coinvolti nella XLP. I risultati ottenuti hanno permesso di identificare e caratterizzare un paziente portatore di mutazioni a carico dei geni di Fas, XIAP e Munc13-4 (dati illustrati nella **Sezione 1** della tesi); di identificare la presenza di frequenti mutazioni a carico del gene di Munc13-4 nei pazienti con ALPS e DALD (dati illustrati nella **Sezione 2** della tesi); di identificare un polimorfismo del gene di SAP che può agire come fattore predisponente per lo sviluppo di ALPS e DALD in soggetti maschi portatori di difetti funzionali a carico di Fas (dati illustrati nella **Sezione 3** della tesi).

Sezione 1

SEZIONE 1

“Presenza di mutazioni a carico dei geni di Fas, Munc13-4 e XIAP in un paziente affetto da una forma atipica di ALPS”

Questo lavoro descrive l’analisi genetica di un paziente che presentava un quadro clinico complesso con aspetti tipici di tre distinte malattie linfoproliferative, ovvero ALPS, FHL e XLP.

I geni coinvolti in queste malattie, i criteri diagnostici e le manifestazioni cliniche sono descritti nella Tabella 1.

La prima osservazione del paziente è avvenuta all’età di quattro anni, in seguito ad un ricovero ospedaliero per trombocitopenia. L’anamnesi indicava la presenza di splenomegalia e linfadenopatia dall’età di 6 mesi. Durante il primo ricovero, il paziente sviluppava anemia, neutropenia e trombocitopenia ricorrenti e multipli attacchi di febbre simil-settica responsiva soltanto alla terapia steroidea. I livelli delle immunoglobuline rientravano nei valori soglia, ma erano presenti anticorpi anti-nucleo e anti-fosfolipidi. Nel sangue erano presenti anche alte concentrazioni di IgG anti-EBV, ma i livelli di IgM anti-EBV erano bassi. La percentuale dei linfociti TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ /CD8 $^-$ doppi negativi (DNT), marcatori dell’ALPS, era leggermente superiore ai limiti di normalità (<2%), con valori massimi di 3.5% dei linfociti periferici. Nel sangue si osservavano valori anormalmente bassi di cellule NK (CD16 $^+$ CD56 $^+$) e NKT (CD3 $^+$ TCR $\alpha_{24}\beta_{11}^+$) rispetto ai soggetti di controllo (pazienti vs 5° percentile dei controlli: NKT=0.01% vs 0.04%; NK=1.4% vs 5%, p<0.05). Le percentuali dei linfociti B (CD19 $^+$), T helper (CD3 $^+$ CD4 $^+$) e CTL (CD3 $^+$ CD8 $^+$), invece, rientravano nei valori normali (dato non mostrato).

All’età di nove anni, il paziente è stato sottoposto a splenectomia. All’età di 12 anni è deceduto per un quadro di coagulazione intravascolare disseminata.

Date le caratteristiche cliniche del paziente, sono stati sequenziati i geni di Fas (*FAS*) e caspasi-10 (*CASP10*) coinvolti nell’ALPS [82-118-127]; i geni di perforina (*PRF1*), Munc13-4 (*UNC13D*) e syntaxina-11 (*STX11*) coinvolti nella FHL [126]; i geni di SAP (*SAP*) e XIAP (*XIAP*) coinvolti nella XLP [128-129]. Poiché un precedente lavoro ha individuato variazioni del gene di OPN (*OPN*) coinvolte nella predisposizione allo sviluppo di ALPS [127], sono state tipizzate anche queste variazioni.

Tabella 1

		Criteri Diagnostici	Pz	
ALPS	Geni Mutati	Fas (ALPS-Fas)	X	
		Fas (ALPS-sFas)		
		FasL (ALPS-FasLg)		
		CASP10 (ALPS-casp)		
	Criteri Clinici	Richiesti:		
		Linfoadenopatia e/o splenomegalia	X	
		Elevati livelli di linfociti Doppia Negativi TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	X	
		Accessori:		
		<i>Primari</i>		
		Difetto nell'apoptosi dei linfociti	X	
		Mutazione genica	X	
		<i>Secondari</i>		
		Livelli sFASL (>200 pg/mL)		
		Livelli Interleuchina-10 (>20 pg/mL)		
		Livelli di Vitamina B12 (>1500 ng/L)	X	
		Livelli di Interleuchina-18 (>500 pg/mL)	X	
		Citopenia Autoimmune e Ipergammaglobulinemia policlonale	X	
Segni immunoistologici	X			
Storia familiare con linfoproliferazione	X			
FHL	Geni Mutati	Sconosciuto (FHL1)		
		<i>PRF1</i> (FHL2)		
		<i>UNC13D</i> (FHL3)	X	
		<i>STX1A</i> (FHL4)		
		<i>STXBP2</i> (FHL5)		
	Criteri Clinici	Febbre	X	
		Splenomegalia	X	
		Citopenia (2/3 linee di cellule)	X	
		Ipertrigliceridemia e/o ipofibrinogenemia		
		Emofagocitosi in BM, milza o LN		
		Iperferritinemia		
		Alti livelli di IL2RA solubile		
Bassa/Assente attività NK	X			
XLP	Geni Mutati	<i>SAP</i> (XLP1)		
		<i>XIAP</i> (XLP2)	X	
	Criteri Clinici	Mononucleosi infettiva fulminante		
		HLH da infezioni di EBV (o altro)		
		Ipogammaglobulinemia/CVID		
		Linfoma maligno dei linfociti-B		
Storia familiare con figli maschi affetti da XLP (origine materna)				

Il paziente presentava tre variazioni missense monoalleleliche nei geni *FAS* (c.755G>A), *XIAP* (c.1189delA) e *UNC13D* (c.2768C>G); queste variazioni erano assenti in 100 soggetti sani di controllo sottoposti a screening. Inoltre, il paziente era anche portatore della variazione 1239A>C del gene di *OPN*, associato precedentemente allo sviluppo di ALPS [127].

Viceversa il sequenziamento degli altri geni non ha identificato nessuna variazione.

La Figura 8 mostra il pedigree del paziente, che dimostra che le variazioni a carico dei geni *FAS*, *XIAP* e *UNC13D* erano state ereditate dalla madre (eterozigote ciascuna mutazione), mentre la variazione del gene *OPN* era stata ereditata dal padre.

Dal punto di vista funzionale la madre mostrava una normale funzione di Fas, mentre il padre, pur non avendo nessuna mutazione, presentava una funzione di Fas difettosa. Dal punto di vista clinico, la madre era affetta da Artrite Reumatoide (AR), mentre il padre era sano. Nella famiglia della madre, inoltre, la mutazione di Fas era anche presente nella zia del paziente, che era anche portatrice della variazione del gene di *OPN* e presentava splenomegalia cronica; viceversa uno zio era portatore della mutazione di *UNC13D* ed era sano. La complessità del quadro genetico della famiglia ha indotto a caratterizzare funzionalmente le variazioni riscontrate nel paziente.

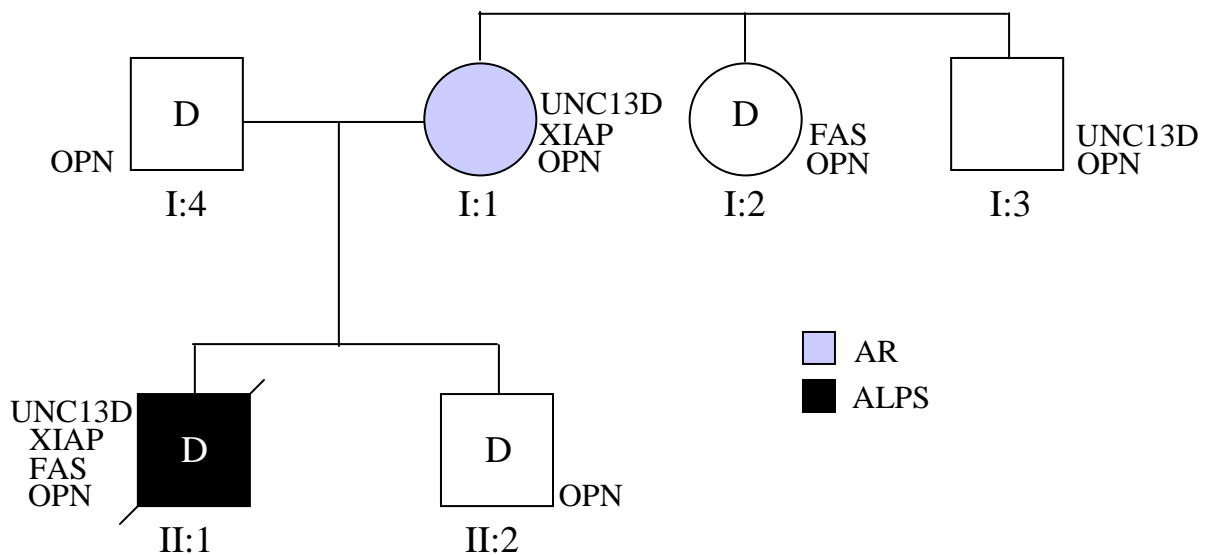


Figura 8
Ereditarietà dei geni di *FAS*, *XIAP*, *OPN*, *UNC13D* nella famiglia del paziente.
 D= difetto a carico del gene di Fas

La variazione c.755G>A di *FAS* è situata nell'esone 7 ed è attesa causare una sostituzione aminoacidica p.E178K nella porzione intracellulare adiacente al death domain del recettore (Figura 9).

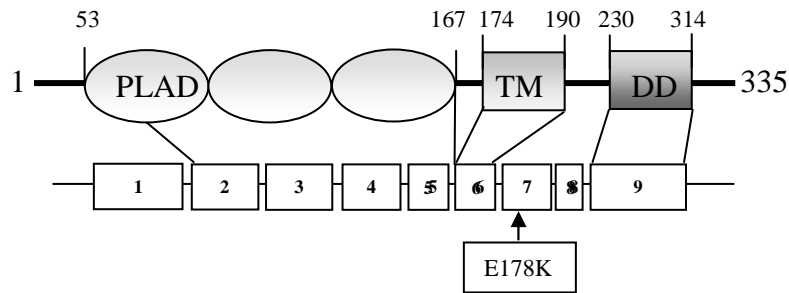


Figura 9

Rappresentazione grafica (non in scala) del gene codificante per il recettore Fas

I numeri indicano la posizione degli aminoacidi; i riquadri gli esoni, la freccia indica la variazione identificata. PLAD: preligand assembly domain; TM: transmembrane domain; DD: death domain.

Per valutare gli effetti della mutazione sull'espressione di Fas, è stata condotta una analisi citofluorimetrica sui linfociti di sangue periferico del paziente coltivati in vitro con PHA (1 µg/ml) + IL-2 (10U/ml) per 5 giorni per indurre l'espressione di Fas. Come mostrato in Figura 10, l'espressione di Fas nel paziente era inferiore rispetto a quella osservata nei soggetti di controllo. Per valutare ulteriormente gli effetti della variazione, il cDNA codificante per la forma wild-type (Fas^{WT}) e la forma mutata (Fas^{E178K}) di Fas è stato clonato in un plasmide in presenza dell'epitopo FLAG. I costrutti sono stati trasfettati transientemente nelle cellule 293T; l'anticorpo anti-FLAG riconosceva una banda specifica a 38kDa corrispondente alla proteina Fas. L'analisi in western blotting ha mostrato che le cellule trasfettate con i diversi costrutti esprimevano livelli simili di proteina (Figura 11). Tuttavia, l'attività di caspasi-8, attivata spontaneamente dal Fas trasfettato iperespresso, era inferiore nelle cellule trasfettate con la forma mutata Fas^{E178K} rispetto a quelle trasfettate con la forma wild-type Fas^{WT} (Figura 12). Questo dato suggeriva che la variazione c.755G>A era in grado di ridurre influenzare l'attività di Fas.

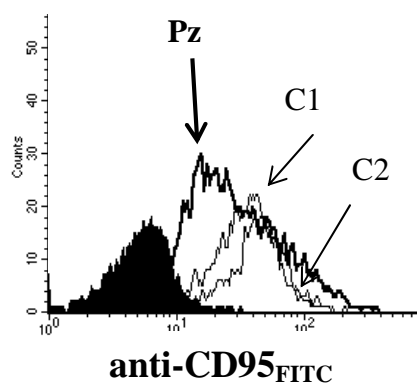


Figura 10

Valutazione dell'espressione di Fas

PBMC del paziente (Pz) e di due controlli sani (C1-C2) sono stati analizzati in citofluorimetria. L'espressione di Fas sulle membrane delle cellule è valutata con un mAb anti-CD95 coniugato con FITC.

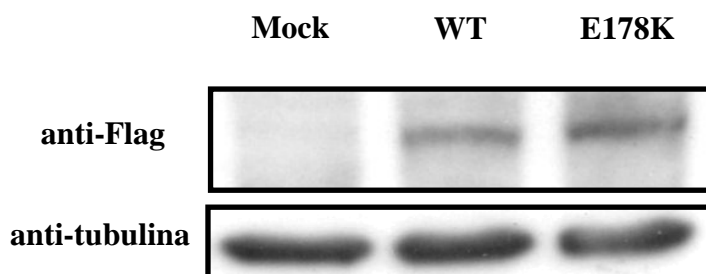


Figura 11

Valutazione dell'espressione di Fas in cellule 293T

Cellule 293T sono trasfettate, per 48 ore, con solo vettore (Mock), con i costrutti contenente il cDNA della forma wild-type (WT) e della forma mutata di Fas (E178K). La rilevazione è effettuata con mAb anti-Flag (38kDa), la normalizzazione è verificata tramite un mAb anti-tubulina (50kDa).

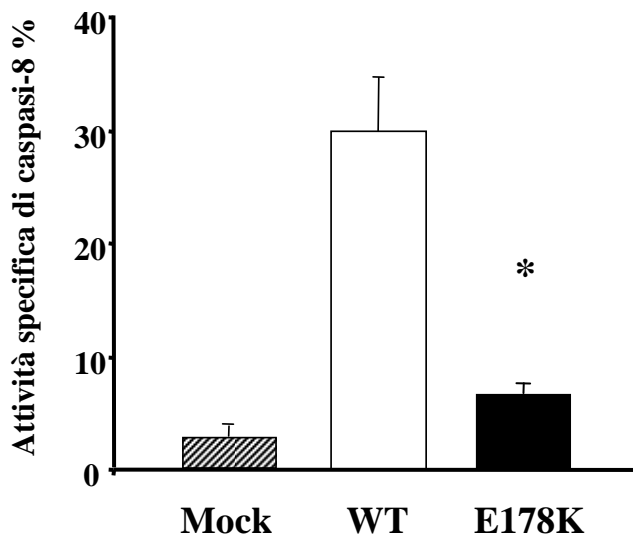


Figura 12

Attività di caspasi-8 in cellule 293T trasfettate

Cellule 293T, dopo 48h di trasfezione, sono state lisate e incubate con il rispettivo substrato. L'attività di caspasi-8 è stata valutata sui lisati proteici mediante un saggio fluorimetrico.

I risultati sono relativi al valore delle cellule non-trasfettate posto uguale a 0%.

Analisi statistica con test U di Mann-Whitney (*p<0.05).

La variazione c.1189delA di *XIAP* è situata nell'esone 6 del gene e consiste in una delezione puntiforme in grado di causare uno slittamento nella cornice di lettura. Questo è atteso produrre una nuova sequenza di 17 aminoacidi (FRYLGATINHLRFWLQI) prima di un segnale di stop che sostituisce la normale porzione carbossi-terminale della proteina portando alla formazione di una proteina tronca di circa 45 kDa. Questa forma mantiene i tre domini BIR e quindi l'attività anti-caspasica, ma perde l'attività E3 ligasica fornita dal dominio RING (Figura 13).

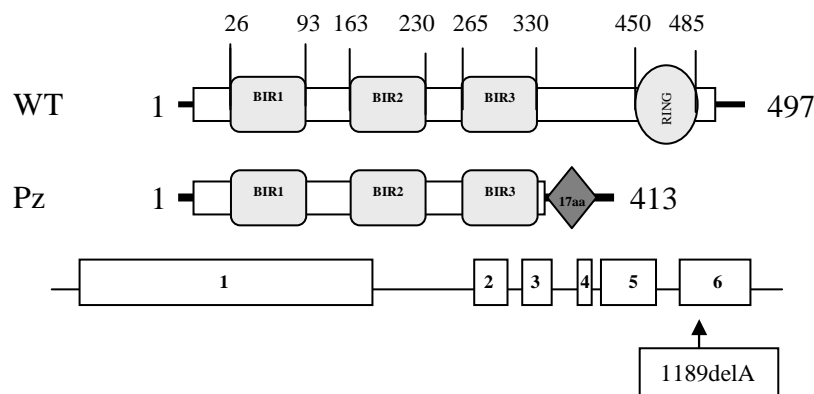


Figura 13

Rappresentazione grafica (non in scala) del gene codificante per la proteina XIAP

I numeri indicano la posizione degli aminoacidi; i riquadri gli esoni, la freccia indica la variazione identificata. BIR: Baculoviral IAP Repeat; RING: Really Interesting New Gene.

WT= wild-type, Pz=Paziente

Per verificare gli effetti della mutazione sull'espressione di XIAP, è stato condotto un saggio di western blotting su lisati totali di linfociti di sangue periferico coltivati in vitro con PHA (1 µg/ml) + IL-2 (10U/ml) e stimolati o meno con etoposide per 6 ore. Come mostrato in Figura 14, l'espressione della proteina XIAP nel paziente era appena rilevabile rispetto a quella osservata nei soggetti di controllo. Inoltre, la valutazione dell'attività di caspasi-9 indotta da etoposide, inibita normalmente da XIAP, era maggiore rispetto a quella osservata nei controlli sani (Figura 14).

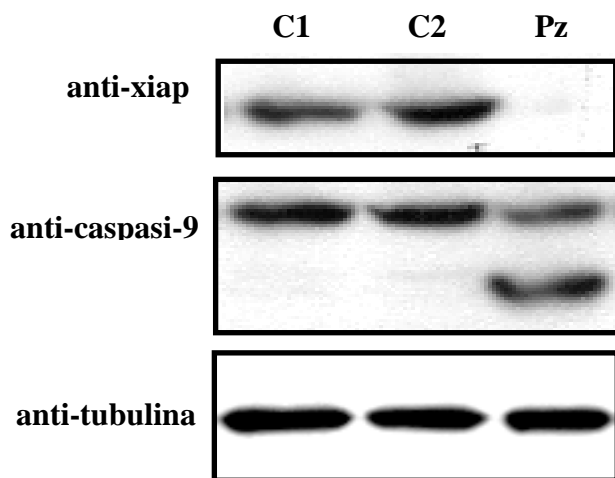


Figura 14
Valutazione dell'espressione di XIAP e attività di caspasi-9 in PBMC
 PBMC del paziente (Pz) e di 2 controlli (C1-C2). La rilevazione è effettuata con un mAb anti-XIAP (56kDa), un mAb anti-caspasi-9 (45kDa); la normalizzazione è verificata tramite un mAb anti-tubulina (50kDa).

Per confermare questi dati, il cDNA codificante per la forma wild-type (XIAP^{WT}) e la forma mutata (XIAP^{X17}) di XIAP è stato clonato in un plasmide contenente la proteina GFP; i costrutti sono stati trasfettati transientemente in cellule Hela dato che questa linea cellulare esprime livelli molto bassi della proteina endogena. L'analisi in western blotting ha mostrato che le cellule trasfettate con XIAP^{X17} esprimevano livelli molto bassi di proteina se paragonati con quelli ottenuti con il costrutto XIAP^{WT} (Figura 15).

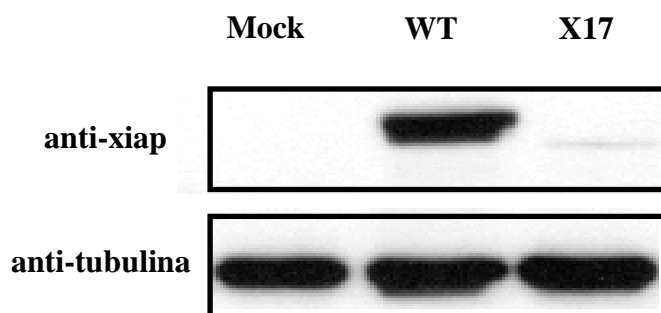


Figura 15
Espressione della forma mutata di XIAP in cellule Hela

Cellule Hela sono trasfettate con solo vettore (Mock), con i costrutti contenente il cDNA della forma wild-type (WT) e della forma tronca di XIAP (X17). La rilevazione è effettuata con un mAb anti-XIAP (56kDa), la normalizzazione è verificata tramite un mAb anti-tubulina (50kDa).

La variazione c.2768C>G del gene *UNC13D* è situata nell'esone 29 ed è attesa produrre la sostituzione aminoacidica p.S923C nel dominio C2B di Munc13-4 coinvolto nel legame con i fosfolipidi di membrana (Figura 16).

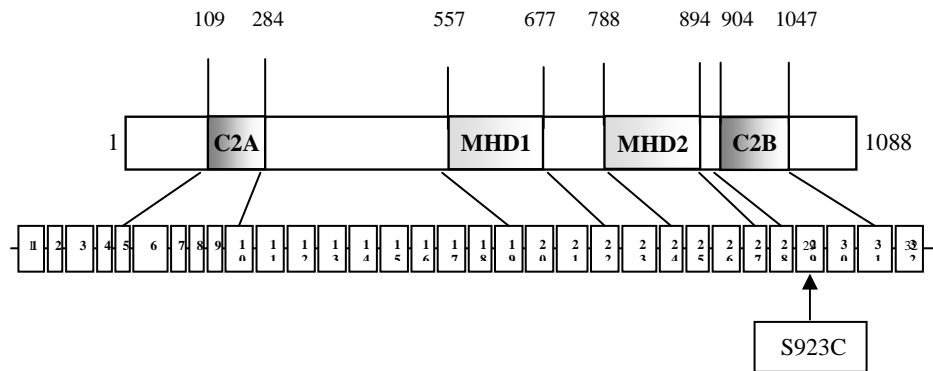


Figura 16

Rappresentazione grafica (non in scala) del gene codificante per la proteina Munc13-4

I numeri indicano la posizione degli aminoacidi; i riquadri gli esoni, la freccia indica la variazione identificata. C2A/B: domini C2A/B; MHD1: Munc13 Homology Domains.

Purtroppo, al momento della identificazione della variazione, il paziente era già deceduto e quindi non è stato possibile valutare l'espressione di Munc13-4 nelle cellule del paziente. Tuttavia, un'analisi "in silico" con il software POLIPHEN ha indicato questa variazione come "potenzialmente dannosa". Per confermare questa possibilità e valutare gli effetti della mutazione il cDNA codificante per la forma wild-type (*Munc13-4^{WT}*) e per la forma mutata (*Munc13-4^{S923C}*) è stato clonato in un plasmide pcDNA3.1 insieme all'epitopo SV5. I costrutti sono stati trasfettati transientemente nella linea mastocitaria HMC-1 e, dopo 48 ore, è stata valutata l'espressione del Munc13-4 trasfettato mediante western blotting con un anticorpo anti-Sv5. La Figura 17 mostra che le cellule trasfettate con i diversi costrutti esprimevano livelli simili di proteina, il che suggeriva che la variazione non era in grado di influenzare l'espressione della proteina. Le proteine RabGTPasi sono coinvolte nella regolazione della formazione, motilità e fusione delle vescicole alla membrana plasmatica. L'associazione tra la proteina Munc13-4 e Rab27a avviene in seguito ad uno stimolo di attivazione. La stimolazione porta la forma attiva di Rab27a (Rab27GTP) ad interagire con

Munc13-4; tale associazione è importante nella regolazione del processo di secrezione [53-57-60]. Al fine di valutare gli effetti della mutazione sull'interazione Munc13-4/Rab27a, è stato condotto un saggio di co-immunoprecipitazione su lisati totali delle cellule HMC-1 trasfettate. La Figura 18A-18B mostra che la proteina Rab27a co-precipitava una quantità maggiore della forma Munc13-4^{WT} rispetto alla forma mutata Munc13-4^{S923C}, suggerendo che la variazione c.2768C>G era in grado di influenzare negativamente l'associazione tra Munc13-4 e Rab27a e quindi probabilmente anche il processo di fusione delle vescicole secretorie con la membrana plasmatica.

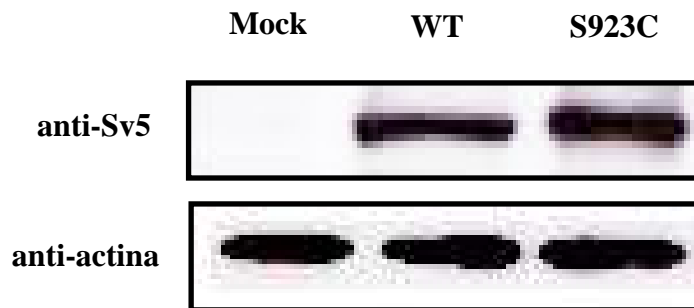


Figura 17

Espressione della forma mutata di Munc13-4 in cellule HMC-1

Cellule HMC-1 sono trasfettate, per 48 ore, con solo vettore (mock), con i diversi costrutti contenenti il cDNA della forma wild-type (WT) e della forma mutata (S923C) di Munc13-4.

La rilevazione è effettuata con un mAb anti-Sv5 (120kDa). La normalizzazione è verificata tramite un mAb anti-actina (43kDa).

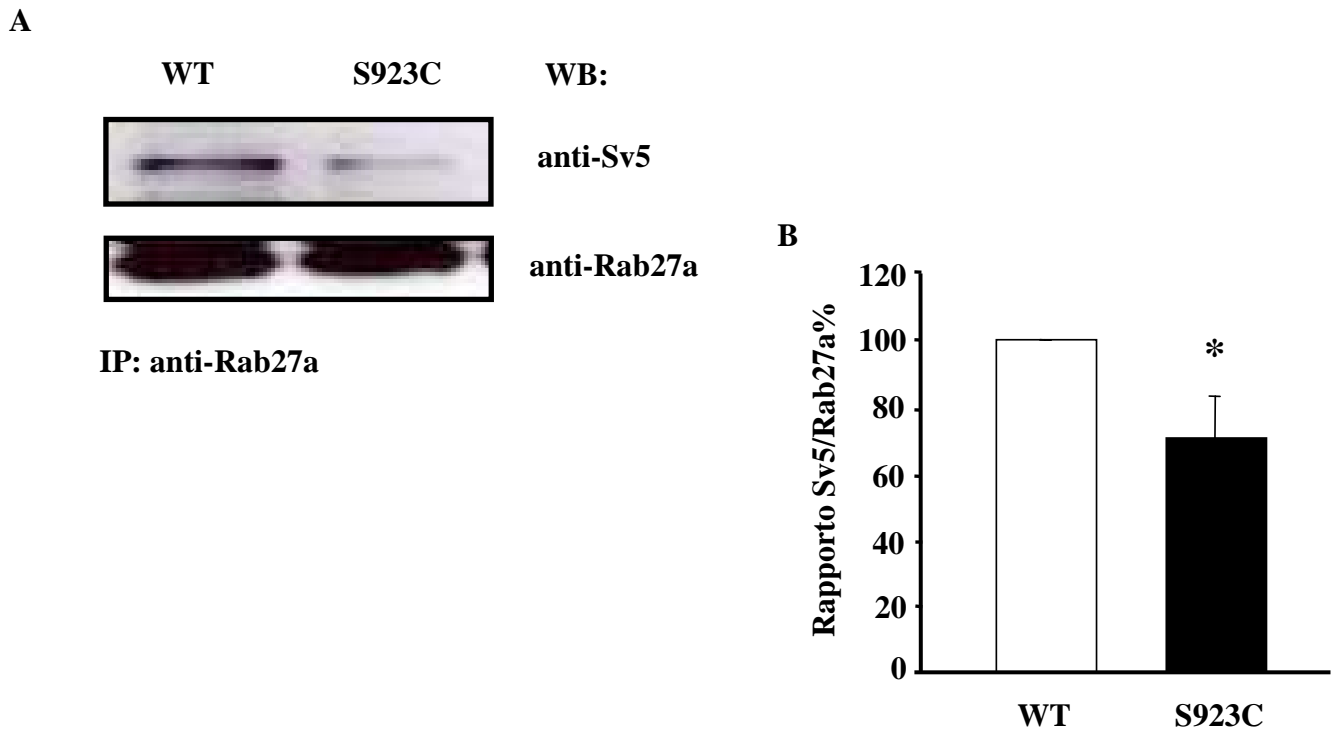


Figura 18

Associazione di Munc13-4 con la proteina Rab27a

(A) Co-Immunoprecipitazione di Munc13-4 con la forma attiva di Rab27a in lisati di cellule HMC-1 trasfettate. La co-immunoprecipitazione è analizzata in western blotting mediante un mAb anti-Sv5; la normalizzazione è verificata tramite un mAb anti-Rab27a.

(B) L'istogramma mostra l'analisi densitometrica espressa come rapporto tra le bande Sv5 e Rab27a. Il rapporto delle cellule trasfettate con la forma wild-type è posta uguale al 100%.

Analisi statistica con test U di Mann-Whitney (* $p < 0.05$).

Materiali e Metodi

Sezione 1

Paziente

Il paziente è un soggetto che è stato in cura presso il Dipartimento di Pediatria dell'Università di Torino. Sono inoltre stati analizzati i genitori del paziente e 100 soggetti sani di controllo ottenuti dallo stesso centro. I prelievi di sangue periferico sono stati ottenuti da ogni soggetto con consenso informato. La diagnosi della malattia è stata effettuata secondo i criteri indicati nell'ALPS NIH International Workshop [118].

Lo studio è stato effettuato secondo le linee guida del comitato etico locale.

Cellule

Cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state isolate da sangue periferico mediante separazione su gradiente di Ficoll (Lympholyte-H, Cedarlane Laboratories, Olanda) dopo essere stato diluito in PBS. Il sangue è stato centrifugato a 1800 rpm per 30 minuti. In seguito sono stati recuperati i PBMC, lavati con PBS e centrifugati una seconda volta a 1500 rpm per 10 minuti. Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI 1640 (Gibco, New York, Usa) addizionato di 1% L-Glutammina, 1X Antibiotici (Penicillina, Streptomina, Gentamicina) e 10% siero fetale bovino (FBS) in presenza di PHA (1µg/ml) e 10U/ml IL-2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) per 6 giorni.

Amplificazione del DNA e ricerca di variazioni nucleotidiche

Le regioni del DNA corrispondenti al promotore, gli esoni con le regioni introniche adiacenti e il 5' e 3' UTR dei geni *FAS* (ID:355), *XIAP* (ID:331), *UNC13D* (ID:201294), *CASP10* (ID:843), *PRF1* (ID 551), *STX11* (ID:8676), *SAP* (ID:4068) e *OPN* (ID:166490) sono state amplificate mediante PCR e sottoposte ad analisi tramite sequenziamento diretto per cercare mutazioni e polimorfismi noti e non noti. I campioni sono stati sequenziati mediante Applied Biosystem 3100 Genetic Analyzer utilizzando il kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle-Sequencing (Applied Biosystem, Foster City, CA), dotato di dideossinucleotidi ciascuno legato ad un fluorocromo differente. Seguendo il protocollo consigliato dalla ditta, per un volume finale di reazione di 10 µl, sono stati addizionati al DNA purificato, 2 µl di BigDye Sequencing Buffer (in dotazione con il kit), l'oligonucleotide (3.2 µM/µl). La reazione di sequenziamento prevede l'utilizzo del seguente programma:

96°C 1'	} 25 cicli	1 ciclo
96°C 10''		
50°C 5''		
60°C 4'		

Il prodotto della reazione è stato purificato, al fine di eliminare gli oligonucleotidi non incorporati, mediante il kit Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup (Millipore, Billerica, MA). 5 µl del purificato sono stati addizionati a 10 µl di formammide e denaturati (3 minuti a 95°C), e caricati su piastra ottica per la successiva analisi al sequenziatore.

Analisi funzionale della variazione nel gene FAS

Il plasmide pcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA) contenente il cDNA wild-type di Fas, con l'epitopo FLAG all'estremità 5', è stato donato dalla Dott.ssa Giovina Ruberti (National Research Council, CNR, Roma). Il plasmide contenente la forma p.E178K è stato ottenuto per mutagenesi sito specifica, mediante PCR, della forma wild-type. Per amplificare la sequenza del cDNA contenente il nucleotide da sostituire, è stata utilizzata una coppia di oligonucleotidi uno dei quali disegnato in modo da permettere la sostituzione c.755G>A. I clonaggi sono stati confermati con il sequenziamento del cDNA di FAS inserito nel plasmide mediante Applied Biosystem 3100 Genetic Analyzer utilizzando il kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle-Sequencing (Applied Biosystem).

Immunofluorescenza

PBMC isolati dal sangue del paziente e da soggetti di controllo sono stati coltivati in terreno RPMI 1640 (Gibco) addizionato di 1% L-Glutammina, 1X Antibiotici (Penicillina, Streptomicina, Gentamicina) e 10% FBS in presenza di PHA (1µg/ml) e 10U/ml IL-2 (Sigma-Aldrich). Dopo 6 giorni, le cellule sono state sottoposte ad analisi citofluorimetrica per valutare l'espressione del recettore Fas. L'immunofluorescenza è stata visualizzata con un anticorpo anti-CD95 coniugato con fluoresceina (FITC) (Biolegend, San Diego, CA). Per ogni condizione 5×10^4 cellule sono state lavate con una soluzione contenente 1% FBS, 0,1% NaN₃ in PBS (Staining Buffer) e successivamente centrifugate per 5 minuti a 1500 rpm. Al pellet è stato aggiunto l'anticorpo coniugato con il fluorocromo ed è stato incubato 15 minuti a 4°C. Dopo un lavaggio in Staining Buffer le cellule sono state centrifugate, risospese in 200 µl dello stesso buffer e analizzate in citofluorimetria.

Trasfezione in cellule 293T

Cellule 293T sono state coltivate in terreno DMEM (Gibco) addizionato di 1% L-Glutammina, 1X Antibiotici (Penicillina, Streptomicina, Gentamicina), 10% FBS e incubate a 37°C in atmosfera umidificata. Le cellule 293T sono state trasfettate con solo il plasmide (Mock), con la forma wild-

type (WT) e la forma mutata (E178K) di Fas utilizzando il kit Lipofectamina-2000 (Invitrogen) seguendo il protocollo fornito dalla ditta.

Western Blotting

Cellule 293T, dopo trasfezione, sono state lisate in un buffer di lisi (Tris-HCl 20 mM pH=7.4, Triton 1%, NaCl 150mM, EDTA 5mM, Glicerolo 10%) contenente inibitori di proteasi (Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina, PMSF) per estrarne le proteine totali. Dopo un'incubazione di 30 minuti in ghiaccio, è stata eseguita una centrifugazione a 13200 rpm a 4°C per 15 minuti. L'estratto proteico è stato dosato mediante l'uso di Protein Assay (Biorad, Hercules, CA). 150 µg di proteine di estratto cellulare sono stati separati mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilammide secondo protocollo standard.

Le proteine sono state analizzate con mAb anti-FLAG (Sigma-Aldrich) e mAb anti-tubulina (Sigma-Aldrich). La rivelazione degli anticorpi primari è stato effettuata con un mAb IgG anti-topo coniugato con perossidasi (HRP, GE, Healthcare, Usa). Le bande sono state quantificate mediante GelDoc EQ system (BioRad).

Attività di Caspasi-8

Cellule 293T trasfettate sono state incubate con o senza anti-CD95 in ghiaccio e, dopo 30 minuti, per 3 ore a 37°C. L'attività di caspasi-8 è stata valutata sui lisati proteici mediante un saggio fluorimetrico (MBL, Watertown, MA). Le cellule sono state lisate con Lysis buffer fornito dal kit, e il lisato ottenuto, incubato con il rispettivo substrato. Il kit utilizzato prevede l'incubazione di 50 µg di lisato totale in tampone in presenza di un substrato specifico, soggetto all'azione proteolitica della caspasi-8, è in grado di emettere fluorescenza. La fluorescenza emessa dai campioni, a seguito di incubazione per 1 ora a 37°C, viene rilevata tramite l'utilizzo di un fluorimetro (FluoroCount, Biorad, Hercules, CA). Due o più lisati di controllo, derivati da controlli sani, sono stati analizzati in parallelo per ciascun esperimento, per definire il range di normalità.

Analisi funzionale della variazione nel gene XIAP

L'RNA totale dei PBMC della madre del paziente è stato isolato mediante Trizol (Invitrogen). Il cDNA della forma wild-type di XIAP è stato ottenuto dalla retrotrascrizione di 500ng di RNA mediante ThermoScript RT PCR System (Invitrogen). La forma della variante mutata c.1189delA è stata ottenuta con una mutagenesi sito specifica, mediante PCR, della forma wild-type.

Per amplificare la sequenza del cDNA contenente la variazione, è stata utilizzata una coppia di oligonucleotidi uno dei quali disegnato in modo da permettere la delezione c.1189delA. I clonaggi sono stati confermati con il sequenziamento del cDNA di XIAP inserito nel plasmide pEGFP (Invitrogen) mediante Applied Biosystem 3100 Genetic Analyzer utilizzando il kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle-Sequencing (Applied Biosystem).

Trasfezione in cellule HeLa

Cellule HeLa sono state coltivate in terreno DMEM (Gibco) addizionato 1% L-Glutammina, 1X Antibiotici (Penicillina, Streptomina, Gentamicina), 10% FBS e incubate a 37°C in atmosfera umidificata. Le cellule HeLa sono state trasfettate con la forma wild type (pEGFP/XIAP^{WT}) e la forma mutata di XIAP (pEGFP/XIAP^{X17}) utilizzando il kit Lipofectamina-2000 (Invitrogen) seguendo il protocollo fornito dalla ditta.

Western Blotting

PBMC sono stati lisati in buffer AKT (Tris-HCl 10mM pH=7.5, Triton 1%, NaCl 10mM, MgCl₂ 10mM, NP-40 1%) contenente inibitori di proteasi (Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina, PMSF) per estrarne le proteine totali. Dopo un'incubazione di 30 minuti in ghiaccio, è stata eseguita una centrifugazione a 13200 rpm a 4°C per 15 minuti. L'estratto proteico è stato dosato mediante l'uso di Protein Assay (Biorad). 150 µg di proteine di estratto cellulare sono stati separati mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilammide secondo protocollo standard. Le proteine sono state analizzate con un mAb anti-XIAP (Sigma), un mAb anti-tubulina (Sigma) e mAb anti-Caspasi-9 (Upstate, New York, USA).

Cellule HeLa, dopo trasfezione, sono state osservate al microscopio confocale per la fluorescenza della proteina GFP. I lisati proteici ottenuti (Buffer di lisi: Tris-HCl 20 mM pH=7.4, Triton 1%, NaCl 150mM, EDTA 5mM, Glicerolo 10%, Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina, PMSF) sono stati analizzati con mAb anti-GFP (Sigma), mAb anti-tubulina (Sigma).

La rivelazione degli anticorpi primari è stato effettuata un mAb anti-Ig di topo coniugato con HRP GE-Healthcare). Le bande sono state quantificate mediante GelDoc EQ system (BioRad).

Attività di Caspasi-9

PBMC sono stati coltivati in terreno RPMI 1640 (Gibco) addizionato di 1% L-Glutammina, 1X Antibiotici (Penicillina, Streptomina, Gentamicina) e 10% FBS in presenza di 10 U/ml IL-2 e attivati con 1 µg/ml (t=0) e riattivati con 0,1 µg/ml (t=8) di PHA. Al 4° giorno dopo la ristimolazione (t=12), 6x10⁶ cellule sono state incubate con o senza etoposide (5µg/ml) in ghiaccio.

Dopo 30 minuti, le cellule sono state incubate per 6 ore a 37°C. Le cellule sono state lisate con Lysis buffer, e il lisato ottenuto, incubato con il rispettivo substrato. Il kit utilizzato prevede l'incubazione di 50 µg di lisato totale in tampone in presenza di un substrato specifico, soggetto all'azione proteolitica della caspasi-9, è in grado di emettere fluorescenza. La fluorescenza emessa dai campioni, a seguito di incubazione per 1 ora a 37°C, è stata rilevata tramite l'utilizzo di un fluorimetro. Due soggetti sani di controllo sono stati analizzati in parallelo per definire il range di normalità.

Analisi funzionale della variazione nel gene *UNC13D*

Il cDNA wild type di Munc13-4, contenuto nel plasmide pOTB7 (ImaGenes, Berlino, Germania), è stato clonato nel plasmide di espressione pcDNA3.1 (Invitrogen) mediante digestione enzimatica. Il tag Sv5 (Simian-Virus 5) è stato inserito, mediante PCR, all'estremità 5' del cDNA della forma wild-type (pcDNA3.1/Munc^{WT}) e della forma mutata (pcDNA3.1/Munc^{923C}). I clonaggi sono stati confermati con il sequenziamento del cDNA di Munc13-4 inserito nei plasmidi mediante Applied Biosystem 3100 Genetic Analyzer utilizzando il kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle-Sequencing (Applied Biosystem).

Trasfezione in cellule HMC-1

Cellule HMC-1¹ sono state coltivate in terreno RPMI 1640 (Gibco) addizionato di 1% L-Glutammina, 1X Antibiotici (Penicillina, Streptomicina, Gentamicina), 10% FBS e incubate a 37°C in atmosfera umidificata. Le cellule HMC-1 sono state trasfettate con la forma wild type (pcDNA3.1/Munc^{WT}) e la forma mutata di Munc13-4 (pcDNA3.1/Munc^{923C}) utilizzando il kit Lipofectamina-2000 (Invitrogen) seguendo il protocollo fornito dalla ditta. L'avvenuta trasfezione, dopo 48 ore, è stata valutata al microscopio a fluorescenza con un plasmide di controllo contenente la proteina GFP (Green Fluorescent Protein).

Western Blotting

Le cellule HMC-1, dopo trasfezione, sono state lisate in un buffer di lisi (Tris-HCl 50 mM pH=8, Triton 1%, NaCl 150mM, MgCl₂ 1mM) [130] contenente inibitori di proteasi (Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina, PMSF) per estrarne le proteine totali. Dopo un'incubazione di 30 minuti in ghiaccio, è stata eseguita una centrifugazione a 13200 rpm a 4°C per 15 minuti. L'estratto proteico è stato dosato mediante l'uso di Protein Assay (Biorad).

¹ Linea cellulare umana di mastcellule immature [130]

Le proteine sono state analizzate con mAb anti-Sv5, mAb anti-actina (Sigma) e mAb anti-Rab27a (Santa Cruz, CA, USA). La rivelazione degli anticorpi primari è stato effettuata con un mAb anti-Ig di topo coniugato con HRP (GE-Healthcare). Le bande sono state quantificate mediante GelDoc EQ system (BioRad).

Immunoprecipitazione

Le cellule HMC-1 sono state trasfettate con le diverse forme di Munc13-4 come descritto in precedenza. Dopo 48 ore, le cellule sono state raccolte e centrifugate 1500 rpm per 5 minuti. Al pellet risospeso in Tyrod Buffer (Hepes 10mM pH=7.4, NaCl 173mM, KCl 2.9mM, NaHCO₃ 12mM addizionato di CaCl₂ 1.6mM e Glucosio 5mM) è stato aggiunto lo stimolo fMLP 10⁻⁴ M (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine, Sigma-Aldrich) ed è stato incubato 10 minuti a 37°C.

La stimolazione delle cellule è stata bloccata mediante una centrifugazione a 1500 rpm per 1 minuto a 4°C. In seguito le cellule sono state lisate in un buffer di (Tris-HCl 20 mM pH=7.4, Triton 1%, NaCl 150mM, EDTA 5mM, Glicerolo 10%) contenente inibitori di proteasi (Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina, PMSF) per estrarne le proteine totali.

La Proteina-G Sepharose (Amersham, Arlington Heights, IL) è stata incubata con un mAb anti-Rab27a (Santa Cruz). Dopo un'incubazione di 2 ore a 4°C in agitazione, il complesso è stato lavato con PBS e centrifugato a 1200 rpm per 5 minuti a 4°C. Al complesso è stato aggiunto l'estratto proteico ed è stato incubato 2 ore a 4°C in agitazione al fine di favorire il legame del complesso Proteina-G/mAb con la proteina Rab27a. Dopo tre lavaggi in PBS a 1200 rpm per 5 minuti a 4°C, il complesso Proteina-G/mAb/Rab27a è stato caricato su gel di poliacrilammide secondo protocollo standard. La membrana è stata incubata con un mAb anti-Sv5 e mAb anti-Rab27a. La rivelazione degli anticorpi primari è stato effettuata con un IgG mAb anti-Ig di topo coniugato con HRP (GE-Healthcare).

Analisi in silico

La mutazione è stata analizzata con il software POLYPHEN 2.0 (Bork Group, Sunyaev Lab, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) per valutare l'effetto della sostituzione aminoacidica sulla funzione della proteina. Il software considera le informazioni filogenetiche e strutturali della proteina; in questo modo una sostituzione è definita “probabilmente dannosa” quando raggiunge un valore superiore a 2, “possibilmente dannosa” con un punteggio da 1.5 a 2 e “benigna” con un valore inferiore a 1.5. La presenza di nuovi siti di splicing è valutata con il software SpliceView (CNR-ITB, <http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview.html>).

Analisi statistica

L'analisi statistica dei risultati ottenuti dallo studio sulla funzionalità delle proteine è stata calcolata con il test U di Mann-Whitney ($p < 0.05$). Tutti i valori delle p sono stati assunti dal test a due code (cut-off $p < 0.05$).

Discussione

Sezione 1

L'analisi del quadro clinico del paziente (Tabella 1) dimostra un fenotipo che rispetta i criteri clinici necessari per la diagnosi di ALPS, in presenza di alcuni aspetti tipici di XLP, ovvero la riduzione del numero di cellule NK e NKT, e di FHL, ovvero la febbre ricorrente simil-settica, pur senza raggiungere gli "score" diagnostici necessari per fare diagnosi di queste malattie. Questo quadro complesso è in linea con le mutazioni identificate nei geni di *FAS*, *Munc13-4* e *XIAP* coinvolti nello sviluppo di ALPS-FAS, FHL3 e XLP2.

L'analisi familiare dimostra che il paziente aveva ereditato tutte queste variazioni dalla madre (I:1) che non presentava nessun segno di ALPS, FHL e XLP, ma era però affetta da Artrite Reumatoide. Il mancato sviluppo di FHL e XLP non è sorprendente in quanto la madre presentava le mutazioni di *UNC13D* e *XIAP* in eterozigosi, mentre lo sviluppo di FHL3 richiede la presenza di mutazioni su entrambi gli alleli di *UNC13D*; inoltre XLP2 si sviluppa in maschi emizigoti per mutazioni su *XIAP*. La madre, pur essendo portatrice della mutazione in *FAS*, non presentava un difetto funzionale di Fas evidenziabile in vitro, probabilmente a causa di una compensazione funzionale tra la mutazione antiapoptotica di *FAS* e quella proapoptotica di *XIAP*. Questa compensazione non sarebbe stata efficace nel figlio a causa del suo genotipo linfoproliferativo non solo per ALPS-FAS, ma anche per XLP2. Va inoltre sottolineato che il paziente potrebbe avere anche ereditato altri fattori genetici favorevoli lo sviluppo di ALPS dal padre (I:4), il quale presentava un difetto funzionale di Fas pur in assenza di difetti genetici noti. Inoltre, il padre aveva trasmesso al figlio un genotipo di *OPN* noto per indurre la produzione di elevati livelli di osteopontina e favorire lo sviluppo di ALPS probabilmente a causa dell'azione antiapoptotica di questa citochina. Il fenotipo dello zia materna del paziente (I:2), che presentava una linfadenomegalia cronica ed era portatrice della mutazione di *FAS* e del genotipo di *OPN* predisponente per ALPS dimostra che la mutazione di *FAS* ha un lieve ma evidente effetto clinico in presenza di altri fattori predisponenti. Un'ulteriore spinta verso lo sviluppo del quadro linfoproliferativo poteva essere stato dato dalla mutazione di *UNC13D*, tuttavia, il fatto che lo zio materno (I:3), portatore solo della mutazione eterozigote a carico di *UNC13D*, fosse sano dimostra che questa mutazione da sola non è in grado di indurre un fenotipo clinico. L'analisi funzionale delle mutazioni ha dimostrato che tutte avevano un effetto deleterio sul rispettivo prodotto genico. La mutazione di *XIAP* portava a una ridotta produzione della proteina, probabilmente a causa di un'accelerata degradazione del mRNA, come atteso per una mutazione di quel tipo.

La mutazione di *FAS* causava una ridotta espressione di Fas in vivo e una ridotta capacità di Fas di attivare caspasi-8 nelle cellule trasfettate.

La mutazione di *UNC13D* poteva ridurre la funzione di Munc13-4 alterando la sua capacità di interagire con Rab27a, fondamentale per il processo di secrezione dei granuli citotossici di cellule NK e linfociti CTL.

Il fenotipo del paziente suggerisce che tutte queste mutazioni cooperavano al quadro clinico, probabilmente agendo su diversi meccanismi coinvolti sia nello spegnimento della risposta immunitaria sia nella risposta citotossica antivirale. Infatti, i difetti di Munc13-4 e XIAP possono cooperare nel ridurre l'attività dei linfociti citotossici, che sono in prima linea nel controllo delle infezioni virali, ma sono anche coinvolti nello spegnimento della risposta immunitaria attraverso il "fratricidio" di cellule immunitarie attivate. D'altro canto Fas è coinvolto nella apoptosi dei linfociti attivati, ma è anche uno strumento utilizzato dalle cellule citotossiche per uccidere il bersaglio. Pertanto il quadro linfoproliferativo del paziente poteva essere legato sia a una prolungata sopravvivenza dei linfociti attivati dovuta al difetto di spegnimento della risposta immunitaria, sia a una loro iperproliferazione mirata a compensare la loro ridotta efficacia nel contrastare le infezioni virali.

La possibilità di questa cooperazione tra difetto di Fas e difetti a carico delle cellule citotossiche è anche sostenuta da precedenti lavori che dimostravano che mutazioni eterozigoti nel gene *PRF1*, insufficienti da sole a causare FHL2, possono favorire lo sviluppo di ALPS se associate a difetti genetici a carico del sistema di Fas [82].

Sezione 2

SEZIONE 2

“Mutazioni del gene di Munc13-4 come fattore di rischio per lo sviluppo di ALPS/DALD”

Come descritto in precedenza, l'ALPS è causata da difetti genetici in grado di ridurre la funzionalità del sistema Fas ed è caratterizzata da linfadenopatia e/o splenomegalia, manifestazioni autoimmuni e dalla espansione periferica di linfociti DNT e che è stata chiamata DALD. ALPS è una malattia monogenica a penetranza incompleta ed è stato proposto che lo sviluppo del quadro clinico richieda il concorso di fattori genetici e ambientali indipendenti dalla mutazione causale [113].

Dal punto di vista dei fattori genetici predisponenti, il nostro laboratorio ha proposto un ruolo per variazioni nei geni di osteopontina (*OPN*) e perforina (*PRF1*) [82-127].

Per quanto riguarda *OPN*, sono state identificate varianti polimorfiche del gene che determinano la produzione di elevati livelli basali di questa citochina antiapoptotica e che aumentano il rischio di sviluppo di ALPS e DALD nei soggetti portatori di un sistema Fas ipofunzionante. E' stato quindi proposto che l'azione antiapoptotica degli elevati livelli di osteopontina potrebbero peggiorare lo stato di ridotta suscettibilità all'apoptosi dei linfociti di questi pazienti e favorire perciò lo sviluppo della malattia.

Per quanto riguarda *PRF1* sono state identificate mutazioni del gene che riducono la funzionalità di perforina, la quale svolge un'azione chiave per l'attività citotossica dei linfociti CTL e delle cellule NK, e che in eterozigosi possono agire come fattori di rischio per lo sviluppo di ALPS e DALD, mentre in doppia eterozigosi possono causare FHL. E' stato quindi proposto che la ridotta attività citotossica causata da queste mutazioni potrebbe favorire lo sviluppo di ALPS e DALD attraverso due meccanismi: a) una ridotta efficienza del fratricidio delle cellule immuni attivate da parte di NK e CTL, che è un meccanismo di spegnimento della risposta immunitaria alternativo a Fas, oppure b) una ridotta efficienza nel contrasto delle infezioni virali che potrebbe determinare una esagerata linfoproliferazione compensatoria. Da questo punto di vista era anche interessante l'osservazione, descritta nella sezione 1, di un paziente con ALPS-FAS portatore di una mutazione a carico del gene *UNC13D* codificante per Munc13-4, una proteina chiave per la secrezione di perforina, e a sua volta coinvolta nello sviluppo di FHL. Per valutare se, oltre alle mutazioni di *PRF1*, anche quelle di *UNC13D* possano agire come fattori di rischio per lo sviluppo di ALPS e DALD, è stato condotto il

lavoro descritto in questa Sezione 2, che ha sequenziato *UND13D* nei pazienti con ALPS o DALD disponibili nel laboratorio.

Identificazione di nuove variazioni nel gene *UNC13D* in pazienti affetti da ALPS/DALD

La regione di DNA corrispondente al promotore, agli esoni con le regioni introniche adiacenti e il 5' e 3' UTR di *UNC13D* è stato sequenziato nel DNA genomico di 22 pazienti affetti da ALPS (n=8 ALPS-FAS, n=14 ALPS-U) e 20 affetti da DALD.

Sono state identificate sette variazioni eterozigoti in grado di determinare un cambio aminoacidico a livello della proteina. Quattro variazioni erano già state descritte in banca dati in pazienti affetti da FHL: p.A59T (c.175G>A), p.R928C (c.2782C>T), p.I848L (c.2542A>C) e p.A995P (c.2983G>C) [130-131-132]. Tre variazioni, invece, non erano mai state descritte: p.C112S (c.335G>C), p.V781I (c.2342G>A) e p.S923C (c.2768C>G). Le variazioni e la loro ereditarietà sono descritte nella Figura 19 e nella Tabella 2. L'ereditarietà dimostra che p.A995P e p.I848L, presenti nello stesso paziente, erano ereditate dallo stesso genitore e quindi erano presenti sullo stesso allele.

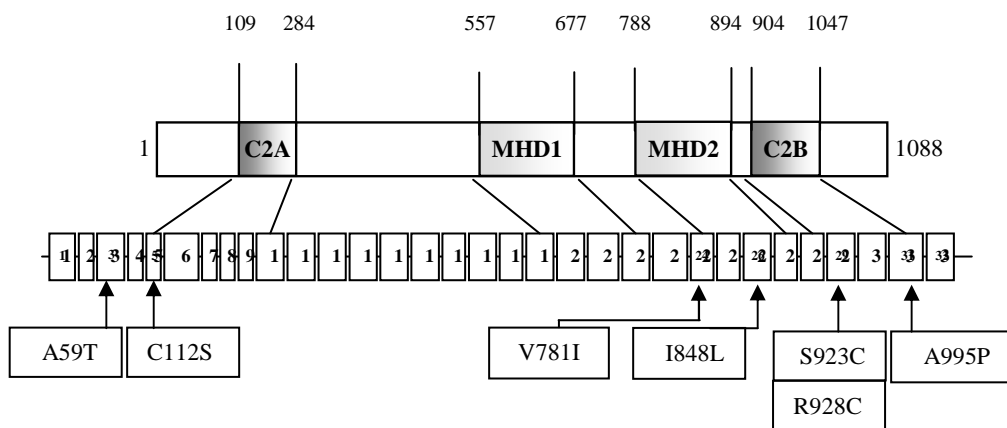


Figura 19

Rappresentazione grafica (non in scala) del gene codificante per la proteina Munc13-4

I numeri indicano la posizione degli aminoacidi; i riquadri gli esoni, le frecce indicano le variazioni identificate. C2A/B: domini C2A/B; MHD1: Munc13 Homology Domains.

Tabella 2

Variazioni nel gene *UNC13D* identificate in pazienti con ALPS o DALD

Paziente (sesso)	Diagnosi	Funzione di Fas*			FAS		UND13D		Altri geni		OPN
		Pz	P	M	Variazione	Ered†	Variazione	Ered†	Variazione	Ered †	1239 A>C
Pz.1 [§] (maschio)	ALPS- FAS	B	D	N	p.E178K c.580G>A	M	p.S923C c.2768C>G	M M	<i>XIAP</i> c.1189delA	M	C
Pz.2 (femmina)	ALPS- FAS	D	D	N	p.Q257H c.819G>C	P	p.R928C c.2782C>T	M or P‡	-		C
Pz.3 (maschio)	ALPS- FAS	D	nd	nd	p.E245K c.781G>A	P	p.C112S c.335G>C	M	-		A
Pz.4 (femmina)	ALPS-U	D	D	D	-	-	p.A59T c.175G>A	M	-		C
Pz.5 (maschio)	ALPS-U	D	D	D	-	-	p.I848L c.2542A>C p.A995P c.2983G>C	M M	-		C
Pz.6 (femmina)	ALPS-U	D	nd	nd	-	-	p.V781I c.2342G>A	nd	-		C
Pz.7 (maschio)	DALD	D	D	D	-	-	p.A59T c.175G>A	P	-		C
Pz.8 (femmina)	DALD	D	D	D	-	-	p.R928C c.2782C>T	M	<i>PRF1</i> A91V	M	C
Pz.9 (maschio)	DALD	D	D	nd	-	-	p.R928C c.2782C>T	M			C

*: D= difettiva, N= normale, B= borderline, Pz= paziente, P= padre, M= madre

†: Ereditarietà: P= padre, M= madre; nd= non determinata (nessun genitore con ALPS, DALD, XLP o FHL); Madre del paziente-1 affetta da AR.

‡: Entrambi i genitori sono eterozigoti per p.R928C

§: Il paziente 1 è lo stesso analizzato in dettaglio nella sezione 1

Al fine di valutare la frequenza di mutazioni di *UNC13D* nella popolazione sana, il gene è stato sequenziato anche in 61 controlli sani etnicamente correlati ai pazienti. In questo gruppo di controllo è stata identificata la variazione p.A59T in cinque soggetti (frequenza allelica 4%), la variazione p.R928C in otto (frequenza allelica 6.5%) ed è stata inoltre identificata in un soggetto una nuova variazione p.P271S (c.811C>T), assente sia nei nostri pazienti sia nelle banche dati (Tabella 3). L'analisi statistica dei dati indicava che la frequenza delle variazioni "missense" "private" (ovvero identificate in un solo soggetto) era significativamente più alta nei pazienti con ALPS rispetto ai pazienti con DALD e ai controlli (frequenza allelica: 9% vs 0% e 0.8%, p=0.017).

Caratterizzazione delle variazioni presenti nel gene *UNC13D*

Al fine di determinare gli effetti delle variazioni sull'espressione e funzione della proteina Munc13-4, è stata inizialmente compiuta una analisi "in silico" mediante l'uso dei software POLIPHEN, SIFT e SpliceView. I risultati sono mostrati nella Tabella 3 e suggeriscono che solo p.S923C e p.P271S hanno caratteristiche tali da far prevedere un effetto sull'espressione o sulla funzione della proteina.

Per valutare in vivo gli effetti delle mutazioni è stato clonato il cDNA codificante per la forma wild-type (Munc^{WT}) e per le forme mutate Munc^{271S}, Munc^{112S}, Munc^{781I}, Munc^{848L}, Munc^{923C}, Munc^{995P} e per il doppio mutante Munc^{848L/995P} che sono poi state trasfettate nella linea mastocitaria HMC-1, comunemente utilizzata per studiare la secrezione vescicolare. Tutti i cDNA erano anche portatori dell'epitopo Sv-5 necessario per il riconoscimento della forme trasfettate. Dopo una trasfezione transiente di 48 ore, è stata valutata l'espressione delle diverse forme mediante western blotting con un anticorpo anti-Sv5. La Figura 20 mostra che le cellule trasfettate con il costrutto Munc^{112S}, Munc^{271S} e soprattutto Munc^{848L/995P} presentavano una espressione inferiore rispetto a quella ottenuta nelle cellule trasfettate con il costrutto wild-type, mentre il costrutto Munc^{995P} esprimeva livelli maggiori e i costrutti Munc^{848L}, Munc^{781I} e Munc^{923C} livelli simili al wild-type.

Tabella 3**Variazioni missense identificate in pazienti con ALPS, DALD e controlli sani**

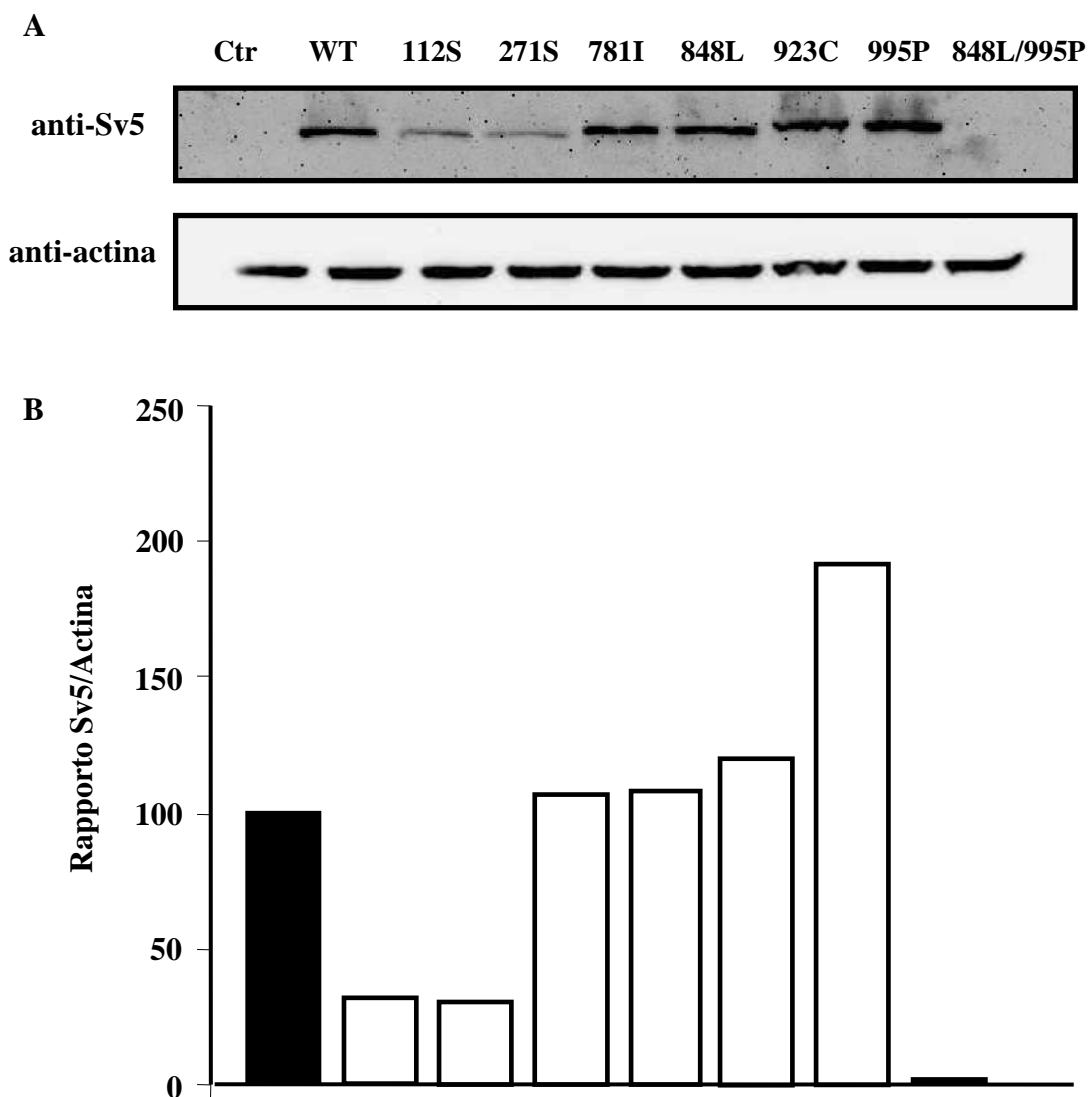
Variazioni	Effetto previsto			Alleli ALPS (N=44)	Alleli DALD (N=40)	Alleli Controllo (N=122)
	Poly Phen*	SIFT†	Splice View‡			
R928C	D	T	NSD	1	2	8
A59T	B	T	no	1	1	5
<i>Alleli totali con variazioni</i>				2	3	13
Variazioni private						
S923C	D	NT	no	1	0	0
I848L	B	T	no	1	0	0
A995P	B	T	no	1	0	0
C112S	B	T	no	1	0	0
V781I	B	T	no	1	0	0
P271S	D	T	NSD	0	0	1
<i>Variazioni totali</i>				5	0	1
<i>Alleli totali con variazioni</i>				4	0	1
					<i>P=0.017[§]</i>	

*: D= probabilmente dannosa, B= benigna

†: NT= non tollerata, T= tollerata

‡: NSD= nuovo sito donatore di splicing, no= nessun effetto

§: Test di Fisher per gli alleli con variazioni private

**Figura 20****Espressione delle forme mutate di Munc13-4 in cellule HeLa trasfettate**

(A) Cellule HeLa non trasfettate (Ctr); costrutto contenente il cDNA della forma wild-type di Munc13-4 (WT); costrutto contenente il cDNA della forma mutata p.C112S (112S), p.P271S (271S), p.V781I (781I), p.I848L (848L), p.S923C (923C), p.A995P (995P), p.I848L+A995P (848L/995P). L'analisi è compiuta 48 ore dopo la trasfezione. La rilevazione è effettuata con un mAb anti-Sv5 (120kDa); la normalizzazione è verificata tramite un mAb anti-actina (43kDa).

(B) L'istogramma mostra l'analisi densitometrica della espressione proteica di Munc13-4 in cellule HeLa. Il valore della normalizzazione relativa alla forma wild-type è posta uguale a 100%.

Dati preliminari.

Materiali e Metodi

Sezione2

Pazienti

Sono stati analizzati 42 pazienti affetti da ALPS (n=8 ALPS-FAS, n=14 ALPS-U) e 20 pazienti con DALD provenienti dal Dipartimento di Pediatria dell'Università di Torino. I prelievi di sangue periferico sono stati ottenuti da pazienti e controlli sotto consenso informato. La diagnosi della malattia è stata effettuata secondo i criteri indicati nell'ALPS NIH International Workshop [118]. Nessun paziente rientrava nei criteri diagnostici per FHL. Sono stati analizzati 61 soggetti sani come controllo. Tutti i pazienti e i controlli erano italiani di origine caucasica e non imparentati tra loro. Lo studio è stato effettuato secondo le linee guida del comitato etico locale.

Amplificazione del DNA e ricerca di variazioni nel gene SH2D1A

La regione del DNA corrispondente agli esoni con le regioni introniche adiacenti del gene *UNC13D/Munc13-4* (ID:201294) è stata amplificata mediante PCR e sottoposta ad analisi tramite sequenziamento diretto per cercare mutazioni e polimorfismi noti e non noti. I campioni sono stati sequenziati mediante Applied Biosystem 3100 Genetic Analyzer utilizzando il kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle-Sequencing (Applied Biosystem) dotato di dideossinucleotidi ciascuno legato ad un fluorocromo differente. Seguendo il protocollo consigliato dalla ditta, per un volume finale di reazione di 10 µl, sono stati addizionati al DNA purificato, 2 µl di BigDye Sequencing Buffer (in dotazione con il kit), l'oligonucleotide (3.2 µM/µl). La reazione di sequenziamento prevede l'utilizzo del seguente programma:

96°C 1'	1 ciclo
96°C 10''	} 25 cicli
50°C 5''	
60°C 4'	

Il prodotto della reazione è stato purificato, al fine di eliminare gli oligonucleotidi non incorporati, mediante il kit Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup (Millipore). 5 µl del purificato sono stati addizionati a 10 µl di formammide e denaturati (3 minuti a 95°C), e caricati su piastra ottica per la successiva analisi al sequenziatore. Le variazioni missense identificate nei pazienti sono state ricercate anche nei genitori.

Plasmidi e clonaggio della forma wild-type e delle forme mutate di Munc13-4

Il cDNA wild type di Munc13-4, contenuto nel plasmide pOTB7 (ImaGenes) è stato clonato nel plasmide di espressione pcDNA3.1 (Invitrogen) mediante digestione enzimatica. Il tag Sv5 (Simian-Virus 5) è stato inserito, mediante PCR, all'estremità 5' del cDNA della forma wild-type e delle forme mutate.

La mutagenesi sito specifica della forma wild-type è stata ottenuta, tramite PCR, con oligonucleotidi contenenti le mutazioni specifiche. Per amplificare la sequenza del cDNA contenente il nucleotide da sostituire, è stata utilizzata una coppia di oligonucleotidi uno dei quali disegnato in modo da permettere le diverse sostituzioni. I clonaggi sono stati confermati con il sequenziamento del cDNA di Munc13-4 inserito nei plasmidi mediante Applied Biosystem 3100 Genetic Analyzer utilizzando il kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle-Sequencing (Applied Biosystem).

Trasfezione in cellule HeLa

Cellule HeLa sono state coltivate in terreno DMEM (Gibco) addizionato di 1% L-Glutamina, 1X Antibiotici (Penicillina, Streptomina, Gentamicina), 10% FBS e incubate a 37°C in atmosfera umidificata.

Le cellule HeLa sono state trasfettate utilizzando il kit Lipofectamina-2000 (Invitrogen) seguendo il protocollo fornito dalla ditta. Le trasfezioni sono state effettuate con il plasmide contenente la forma wild-type di Munc13-4 (Munc13-4^{WT}) e le forme mutate (Munc13-4^{112S}, Munc13-4^{271S}, Munc13-4^{781I}, Munc13-4^{848L}, Munc13-4^{923C}, Munc13-4^{995P}, Munc13-4^{848L/995P}). L'avvenuta trasfezione, dopo 48 ore, è stata valutata al microscopio a fluorescenza con un plasmide di controllo contenente la proteina GFP (Green Fluorescent Protein).

Western Blotting

Dopo la trasfezione, le cellule HeLa sono state lisate in un buffer di lisi (Tris-HCl 50 mM pH=8, Triton 1%, NaCl 150mM, MgCl₂ 1mM) [130] contenente inibitori di proteasi (Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina, PMSF) per estrarne le proteine totali. Dopo un'incubazione di 30 minuti in ghiaccio, è stata eseguita una centrifugazione a 13200 rpm a 4°C per 15 minuti. L'estratto proteico è stato dosato mediante l'uso di Protein Assay (Biorad). 150 µg di proteine di estratto cellulare sono stati separati mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilammide secondo protocollo standard.

Le proteine sono state analizzate con mAb anti-Sv5, mAb anti-actina (Sigma-Aldrich).

La rivelazione degli anticorpi primari è stato effettuata con un un mAb IgG anti-topo coniugato-HRP (GE-Healthcare). Le bande sono state quantificate mediante GelDoc EQ system (BioRad).

Analisi in silico

Tutte le mutazioni identificate sono state ricercate in banca dati (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Le mutazioni sono state analizzate con il software POLYPHEN 2.0 (Bork Group, Sunyaev Lab, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) per valutare l'effetto delle sostituzioni aminoacidiche sulla funzione della proteina. Il software considera le informazioni filogenetiche e strutturali della proteina; una sostituzione è definita “probabilmente dannosa” quando raggiunge un valore superiore a 2, “possibilmente dannosa” con un punteggio da 1.5 a 2 e “benigna” con un valore inferiore a 1.5. L'analisi è stata compiuta, anche, con il software SIFT 4.0.3 (J. Craig Venter Institute, <http://blocks.fhrc.org/sift/SIFT.html>) basato sull'omologia di sequenza; il software definisce un cambiamento aminoacidico “tollerante” o “non-tollerante” quando raggiunge un valore compreso tra 0 e 1 (cambiamenti “non-tolleranti” presentano un valore ≤ 0.05).

La presenza di nuovi siti di splicing è valutata con il software SpliceView (CNR-ITB, <http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview.html>).

Analisi statistica

L'analisi statistica della distribuzione allelica è stata calcolata con il test di Fisher. Tutti i valori delle p sono stati assunti dal test a due code (cut-off $p < 0.05$).

Discussione

Sezione2

I pazienti affetti da ALPS o DALD sono portatori di difetti funzionali a carico del sistema Fas/FasL e sviluppano malattie autoimmuni e linfoproliferazione [118]. Vari dati suggeriscono che queste siano malattie geneticamente eterogenee e che al loro sviluppo possono contribuire vari fattori genetici in parte causali e in parte predisponenti (fattori modificatori) oltre che fattori ambientali, probabilmente di tipo infettivo in analogia con quanto proposto per molte malattie autoimmuni [113]. In lavori precedenti era stato proposto che un fattore predisponente per lo sviluppo di ALPS e DALD potesse essere una ridotta funzionalità su basi genetiche di perforina [82], uno dei principali effettori della citotossicità cellulo-mediata. Questi dati indicavano che, mentre gravi difetti a carico di entrambi gli alleli del gene di perforina causano FHL, difetti monoallelici modesti e incapaci di indurre di per se un fenotipo patologico possono agire come fattori di rischio per lo sviluppo di ALPS e DALD. Il presente lavoro conferma questa possibilità osservando come i pazienti con ALPS e DALD presentano con considerevole frequenza mutazioni a carico di un altro gene coinvolto nello sviluppo di FHL, ovvero il gene di Munc13-4, una proteina coinvolta nella secrezione di perforina. Anche in questo caso, le mutazioni del gene di Munc13-4 sembrano causare FHL nel caso di gravi lesioni genetiche che colpiscano entrambi gli alleli del gene, mentre agirebbero da fattori di rischio per ALPS e DALD nel caso di lesioni minori che colpiscano un solo allele.

In particolare sono state identificate variazioni del gene di Munc13-4 in 6/22 pazienti affetti da ALPS (27%), 3/20 pazienti DALD (15%) e 14/61 controlli sani (23%). Il dato sembra acquisire maggior interesse valutando solo le mutazioni “private” del gene, ovvero quelle riscontrate solo in un soggetto, risultate presenti in 4/22 pazienti con ALPS-FAS (18%), 0/20 con DALD (0%) e 1/61 controlli (0.8%).

Questa seconda analisi non tiene conto di due mutazioni, p.R928C e p.A59T, che sono state inizialmente identificate in pazienti con FHL, ma che appaiono presenti anche nel 13% (8/61) e 8% (5/61) dei controlli con una frequenza sovrapponibile a quella dei pazienti, il che contrasta con un loro possibile ruolo in ALPS e DALD. Per quanto riguarda p.R928C, presente nel 7% dei pazienti (3/42) e 13% dei controlli (8/61), l’analisi “in silico” suggerisce che possa avere un effetto dannoso sulla funzione della proteina. Inoltre un recente studio genotipo-fenotipo ha identificato la sua presenza in otto pazienti portatori di mutazioni bialleliche provenienti da sette famiglie con FHL non imparentate tra loro [133] ed è stata suggerito che possa essere un modificatore della malattia. Un dato particolare è che nel paziente-8 (DALD) questa mutazione era presente insieme alla mutazione p.A91V di perforina nota per avere un blando effetto negativo nella funzione di questa proteina [60]. E’ anche degno di nota che il paziente-2 (ALPS-FAS) aveva ereditato p.R928C dal padre e la mutazione di *FAS* dalla madre, il che suggerisce che nel figlio l’accumulo delle due

mutazioni possa aver favorito lo sviluppo dell'ALPS. Per quanto riguarda p.A59T, presente nel 5% dei pazienti (2/42) e 8% dei controlli (5/61), l'analisi "in silico" non ha mostrato effetti sulla funzione della proteina ed il suo ruolo è ancor più controverso di quello di p.R928C dato che è stata ritrovata in due famiglie FHL, ma sempre sullo stesso allele contenente una seconda mutazione patogenica.

Le mutazioni "private" presenti nei pazienti con ALPS erano p.I848L e p.A995P, precedentemente descritte in pazienti con FHL, e p.C112S, p.V781I e p.S923C, mai descritte prima. Inoltre nei controlli è stata identificata la mutazione p.P271S, anch'essa mai descritta prima.

La mutazione p.S923C identificata nel paziente-1 (ALPS-FAS, già descritto nella Sezione 1) è localizzata nel dominio C2B, l'analisi "in silico" ha mostrato un possibile effetto della variazione sulla funzione della proteina. Come descritto nella prima parte di questa tesi, la forma mutata Munc^{923C} poteva ridurre la funzione della proteina, alterando la sua capacità di interagire con Rab27a fondamentale per il processo di secrezione dei granuli citotossici. La mutazione era ereditata dalla madre insieme alla mutazione di *FAS* e ad una mutazione di *XIAP*.

La mutazione p.C112S identificata nel paziente-3 (ALPS-FAS) è localizzata nel dominio C2A coinvolto nelle funzioni di Munc13-4. Mentre l'analisi "in silico" non mostrava effetti dannosi sulla proteina, l'analisi in vivo in cellule trasfettate dimostrava una sua ridotta espressione. La mutazione era ereditata dalla madre, mentre la mutazione di *Fas* era ereditata dal padre.

Il paziente-5 era portatore sullo stesso allele di una doppia mutazione, p.I848L localizzata nel dominio MHD2 e p.A995P localizzata in prossimità del dominio C2B. Le analisi "in silico" e in vivo non hanno mostrato nessun effetto per ciascuna di queste variazioni, ma l'analisi in vivo ha dimostrato che la loro combinazione ha un effetto profondamente negativo sull'espressione della proteina.

Questi dati suggeriscono che le variazioni nel gene di *UNC13D* possano essere considerate parte di un "background" oligogenico in grado di predisporre allo sviluppo dell'ALPS insieme ad altri geni come perforina, mutato nel paziente-8, e osteopontina il cui allele predisponente per ALPS/DALD era presente nei paziente-1, -2, -4, -5, -6, -7, -8, -9.

I risultati ottenuti sono dati preliminari; per questo motivo un obiettivo futuro sarà quello di confermare gli effetti delle variazioni sull'espressione di Munc13-4 e valutare eventuali effetti a livello funzionale con particolare attenzione all'associazione con la proteina Rab27a.

E' da notare che variazioni nel gene *UNC13D* potrebbero essere coinvolte anche nello sviluppo di malattie autoimmuni diverse da ALPS, come suggerito da uno studio condotto su un paziente affetto da Artrite Idiopatica Giovanile Sistemica che era portatore di una mutazione eterozigote nel

gene *UNC13D* e presentava ridotta attività citotossica delle cellule NK in assenza delle manifestazioni tipiche della FHL [134].

E' pertanto possibile ipotizzare che anche *UNC13D* possa essere coinvolto nella predisposizione a varie malattie autoimmuni, come già dimostrato per *PRFI* le cui variazioni sono state associate a ALPS, DALD, diabete mellito di tipo-1, sclerosi multipla, anemia emolitica e artrite reumatoide giovanile [135-136].

Sezione 3

SEZIONE 3

“Polimorfismi del gene di SAP come fattore di rischio per lo sviluppo di ALPS/DALD”

SAP è una proteina adattatrice intracellulare caratterizzata da un dominio SH2. La proteina è coinvolta nella trasduzione del segnale e nell'attivazione dei linfociti; essa regola la funzione di alcuni recettori appartenenti alla famiglia di SLAM i quali sono coinvolti nei processi di regolazione della citotossicità delle cellule NK, della formazione delle cellule NKT, della stimolazione delle cellule T_H2, dello *switch* isotipico e del mantenimento delle cellule secernenti anticorpi [83-87]. Il gene *SAP* è localizzato sul cromosoma X (Xq25-q26) e consiste di quattro esoni e tre introni. Mutazioni deleterie a carico di *SAP* sono una causa della XLP (X-linked lymphoproliferative disease) o sindrome di Duncan. La sindrome colpisce i maschi ed è caratterizzata da una ridotta capacità di controllare le infezioni da EBV (Epstein Barr Virus) con infezioni fulminanti di mononucleosi, linfoproliferazione policlonale e/o linfoma delle cellule B e disgammaglobulinemia che può progredire in ipogammaglobulinemia [94].

Il ruolo di SAP nell'autoimmunità non è ancora chiaro; tuttavia, alcuni studi hanno suggerito il suo possibile coinvolgimento in alcune malattie autoimmuni come artrite reumatoide e sclerosi multipla [107].

Komori et al. hanno mostrato che in topi *MRL^{lpr/lpr}* una mutazione nel gene *SAP* può causare la perdita di espressione di SAP determinando una parziale protezione dalla malattia autoimmune linfoproliferativa tipica del carattere *lpr* [128]; questo dato ha suggerito una relazione epistatica opposta tra i difetti di Fas e quelli di SAP.

Scopo di questo lavoro è stato quello di analizzare il gene *SAP* (*SH2D1A*) in pazienti affetti da ALPS e DALD per valutare il coinvolgimento del gene come fattore modificatore per lo sviluppo della malattia nell'uomo al fine di confermare nell'uomo i dati ottenuti nei topi *MRL^{lpr/lpr}* [128].

Analisi genetica

Al fine di valutare un coinvolgimento di *SAP* nello sviluppo di ALPS e DALD, la regione del DNA corrispondente al promotore, ai quattro esoni con le regioni introniche adiacenti e al 5' e 3' UTR del gene è stata sequenziata nel DNA genomico di 31 pazienti affetti da ALPS (n=6 ALPS-FAS; n=9 ALPS-U) o DALD (n=16) e in 369 soggetti di controllo, tutti di sesso maschile dato che le malattie legate al cromosoma X colpiscono in prevalenza i maschi.

I risultati del sequenziamento non hanno mostrato nessuna mutazione nei pazienti e nei controlli, ma hanno evidenziato tre polimorfismi a singolo nucleotide (SNP): -346C>T (rs12164382), -494G>A (rs7357894) e -631G>A (rs990545) (numerazione $\underline{A}TG=+1$). Gli SNP erano già descritti nelle banche dati².

L'analisi della distribuzione allelica di questi SNP nei pazienti e nei controlli ha dimostrato che gli alleli -346T e -631A sono più frequenti nei pazienti rispetto ai controlli (-346T: 61% vs 36% p=0.01; -631A: 61% vs 37% p=0.01) (Tabella 4).

L'analisi ha mostrato, anche, che la presenza dell'allele -346T aumenta di circa 2 volte il rischio di sviluppare ALPS o DALD (OR=2.78; 95% IC: 1.24-6.30; p=0.01), e un simile effetto è esercitato dall'allele -631A (OR=2.74; 95% IC: 1.22-6.22; p=0.01) (Tabella 4). Nessuna differenza significativa è stata trovata per l'allele -494G>A.

L'analisi è stata quindi estesa alle femmine valutando le frequenze alleliche e genotipiche in 20 pazienti con ALPS (n=3 ALPS-FAS; n=9 ALPS-U) o DALD (n=8) e in 165 controlli. I risultati hanno mostrato che le frequenze alleliche e genotipiche erano uguali tra pazienti e controlli e simili a quelle osservate nei controlli maschi (Tabella 5).

Inoltre, le frequenze alleliche delle variazioni -346T e -631A erano significativamente più alte nei pazienti maschi che nelle pazienti femmine (-346T: 61% vs 31% p=0.029; -631A: 61% vs 34% p=0.049). Nessuna differenza significativa è stata trovata nella frequenza dell'allele -494G>A (Tabella 5).

² <http://snpper.chip.org>

Tabella 4**Frequenza allelica degli SNP nel gene *SH2D1A* in pazienti maschi con ALPS/DALD e controlli**

Allele	-346 C>T		Allele	-494 G>A		Allele	-631 G>A	
	Controlli ^a	Pazienti		Controlli	Pazienti		Controlli	Pazienti
C	235 (64%)	12 (39%)	G	215 (58%)	22 (71%)	G	234 (63%)	12 (39%)
T	134 (36%)	19 (61%)	A	154 (42%)	9 (29%)	A	135 (37%)	19 (61%)
Totale	369	31		369	31		369	31
	OR: 2.78 (1.24-6.30)			NS^c			OR: 2.74 (1.22-6.22)	
	P=0.01^b						P=0.01	

a: numero di soggetti; la proporzione è indicata tra parentesi

b: pazienti vs controlli; OR: Odds Ratio (95% intervallo di confidenza)

c: non significativo

Tabella 5**Frequenza allelica degli SNP nel gene *SH2D1A* in pazienti femmine con ALPS/DALD e controlli**

Allele	-346 C>T		Allele	-494 G>A		Allele	-631 G>A	
	Controlli ^a	Pazienti		Controlli	Pazienti		Controlli	Pazienti
C	206 (62%)	27 (69%)	G	191 (58%)	25 (59%)	G	203 (61%)	26 (66%)
T	124 (38%)	13 (31%)	A	139 (42%)	15 (41%)	A	127 (38%)	14 (34%)
Totale	330	40		330	32		330	32
Genotipo								
CC	67 ^b (40%)	9 (45%)	GG	55 (33%)	8 (40%)	GG	65 (40%)	9 (45%)
CT	72 (44%)	9 (45%)	GA	81 (49%)	9 (45%)	GA	73 (44%)	8 (40%)
TT	26 (16%)	2 (10%)	AA	29 (18%)	3 (15%)	AA	27 (16%)	3 (15%)
Totale	165	20		165	20		165	20

a: numero di cromosomi; le proporzioni sono indicate tra parentesi

b: numero di soggetti; le proporzioni sono indicate tra parentesi

Al fine di identificare una associazione tra i polimorfismi identificati nelle regione del promotore, è stato utilizzato il software Haploview per l'analisi del *linkage disequilibrium* (LD). Il programma ha permesso di rilevare un elevato LD tra i tre SNP; in particolare l'allele -346C>T era in perfetto equilibrio con l'allele -631G>A ($D' = 0.96$, $r^2 = 0.8$) come mostrato in Tabella 6.

L'analisi "in silico" con il software TESS (Transcription Element Search System³) ha permesso di osservare che i tre SNP identificati non erano in grado di modificare il sito di legame per i fattori trascrizionali. Tuttavia, dati in letteratura hanno identificato l'allele -346C come un potenziale sito di metilazione [137] suggerendo che la variazione -346C>T possa influenzare l'espressione del gene *SAP*. Per questo motivo, il lavoro è stato successivamente focalizzato sulla variazione -346C>T.

Tabella 6
Linkage Disequilibrium dei tre SNP nel gene *SH2D1A*

	-631G>A	-494G>A	-346C>T
-631G>A		$D' = 1$ $r^2 = 0.5$	$D' = 0.96$ $r^2 = 0.8$
-494G>A	$D' = 1$ $r^2 = 0.5$		$D' = 0.95$ $r^2 = 0.46$
-346C>T	$D' = 0.96$ $r^2 = 0.8$	$D' = 0.95$ $r^2 = 0.46$	

³ <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess>

Per valutare l'associazione di -346C>T in ALPS e DALD separatamente, i pazienti sono stati suddivisi secondo la loro diagnosi. I risultati hanno mostrato che la frequenza dell'allele -346T era sovrapponibile nei pazienti affetti da ALPS o DALD sia nei maschi (ALPS: 60%, n=15; DALD: 62%, n=16) che nelle femmine (ALPS: 33%, n=12; DALD: 31%, n=8).

In seguito, lo studio è stato esteso a pazienti affetti da Sclerosi Multipla (SM) al fine di valutare se -346T fosse un fattore predisponente allo sviluppo di malattie autoimmuni diverse da ALPS e DALD. La tipizzazione di -346C>T in 386 pazienti con SM (229 maschi, 157 femmine) ha mostrato che le frequenze alleliche e genotipiche in questi pazienti erano simili a quelle dei controlli con nessuna differenza di genere (38% sia nei maschi che nelle femmine).

L'analisi è stata quindi estesa ai genitori dei pazienti tipizzando -346C>T nei padri (n=21) e nelle madri (n=22) disponibili di pazienti maschi affetti da ALPS o DALD. I risultati hanno mostrato che tra gli alleli non-trasmessi (allele paterno e allele materno non-trasmesso), le frequenze erano simili a quelle osservate nel gruppo di controllo (-346C: 60%; -346T: 40%), il che conferma che la popolazione utilizzata come controllo era etnicamente omogenea alle famiglie dei pazienti. Inoltre l'analisi delle madri eterozigoti per -346C>T mediante il Test di Trasmissione Disequilibrio (TDT) ha mostrato una tendenziale maggiore trasmissione dell'allele -346T (allele trasmesso:allele non-trasmesso = 9:4), ma il dato non era statisticamente significativo a causa del piccolo numero di soggetti (p=0.166).

Analisi funzionali

Una prima analisi ha valutato se -346C>T venisse a interessare un sito di metilazione del gene, analizzando lo stato di metilazione dell'allele -346C in PBMC di soggetti sani di controllo mediante una PCR metilazione-specifica. I risultati hanno mostrato che l'allele -346C era metilato per circa il 30% (dato non mostrato), il che suggeriva un coinvolgimento dello SNP nella regolazione dell'espressione di SAP.

Al fine di valutare l'influenza della variazione -346C>T sull'espressione della proteina, sono stati analizzati i livelli di mRNA di SAP nei PBMC derivati da soggetti maschi sani di controllo portatori dell'una o dell'altra variante dello SNP (-346C n=10, 346T n=10) mediante real-time PCR. L'analisi dell'espressione dell'mRNA di SAP è stata effettuata sulle cellule dopo 3 giorni di coltura con PHA+10U IL-2 poiché in condizioni basali l'espressione di SAP è minima. Come mostrato in Figura 21, i portatori dell'allele -346T producevano più alti livelli di mRNA di SAP

rispetto ai portatori dell'allele -346C ($p=0.001$), questo dato supporta l'ipotesi che la metilazione dell'allele -346C possa ridurre l'espressione di SAP.

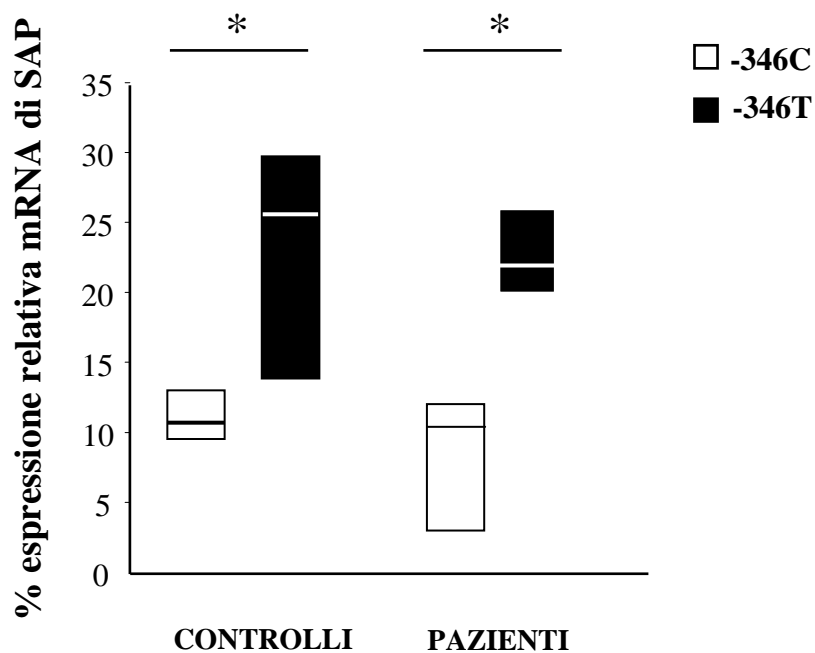


Figura 21

Espressione di SAP a livello dell'mRNA in PBMC attivati

Analisi dell'espressione di SAP a livello dell'mRNA in PBMC derivati da pazienti maschi (-346C: n=5; -346T: n=4) e da soggetti sani (-346C: n=10; -346T: n=10).

La quantificazione dell'mRNA di SAP è valutata tramite Real time PCR.

Il livello medio di espressione dei campioni -346C è posto come 100%; la linea orizzontale indica il valore medio, il box-plot l'intervallo di interquartile. Analisi statistica con test U di Mann-Whitney (** $p<0.01$; * $p<0.05$).

Al fine di verificare gli effetti della variazione -346C>T sull'espressione di SAP nelle diverse popolazioni linfocitarie, è stata effettuata una purificazione di cellule NK (CD16⁺), linfociti T helper (CD4⁺), T citotossici (CD8⁺) utilizzando biglie magnetiche in positivo su PBMC di soggetti maschi sani (-346C n=6; -346T n=6) dopo la loro coltura con PHA+10U IL2. I risultati hanno mostrato che i portatori dell'allele -346T esprimevano livelli di mRNA di SAP più elevati rispetto ai portatori dell'allele -346C a livello delle cellule CD16⁺ (p=0.002) e CD8⁺ (p=0.009), ma non dei CD4⁺ (Figura 22, pannello di sinistra).

Per confermare questi risultati, questi esperimenti sono stati ripetuti purificando in negativo con la tecnica delle rosette cellule NK e linfociti T CD8⁺ di soggetti maschi sani di controllo (-346C n=5; -346T n=5) partendo da PBMC freschi; le cellule purificate sono poi state attivate con PHA+10U IL-2. L'analisi dell'espressione dell'mRNA di SAP ha confermato l'espressione di livelli più elevati nei portatori dell'allele -346T rispetto ai portatori dell'allele -346C in entrambe le popolazioni cellulari (Figura 22, pannello destro).

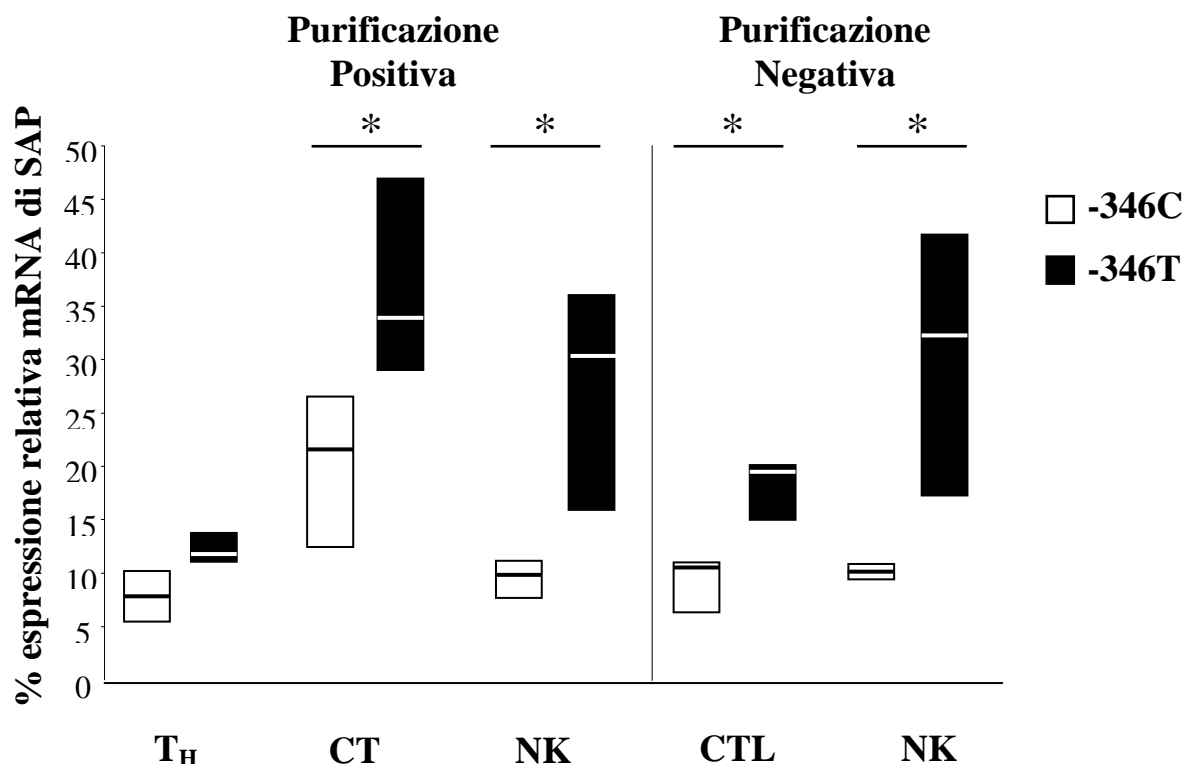


Figura 22

Espressione di SAP a livello dell'mRNA in linfociti e cellule NK in soggetti maschi sani

Linfociti T helper (Th), linfociti T citotossici (CT), cellule NK (NK) sono stati purificati positivamente da PBMC attivati (-346C: n=6; -346T: n=6) con biglie magnetiche. La purificazione negativa da PBMC attivati è stata effettuata con la tecnica delle Rosette (-346C: n=5; -346T: n=5). Quantificazione dell'mRNA di SAP mediante Real time PCR. La linea orizzontale indica il valore medio, il box-plot l'intervallo di interquartile. Analisi statistica con test U di Mann-Whitney (*p<0.05).

Inoltre la valutazione dello stato di metilazione dei campioni -346C ha dimostrato che era più metilato nei PBMC rispetto alle cellule NK e ai linfociti T CD8⁺ (Figura 23).

Al fine di confermare i dati ottenuti nei soggetti di controllo, l'analisi quantitativa dell'mRNA di SAP è stata estesa ai PBMC ottenuti da pazienti maschi affetti da ALPS/DALD. I risultati hanno mostrato che i pazienti portatori dell'allele -346T (n=4) mostravano più alti livelli di mRNA rispetto ai pazienti portatori dell'allele -346C (n=5), confermando i dati ottenuti nei soggetti sani (espressione relativa, [intervallo di mediana]: 219%, [158-262]; 100%, [33-150] p=0.016). L'analisi dello stato di metilazione, inoltre, ha mostrato che l'allele -346C era metilato per circa il 24% (intervallo 17-29) nei PBMC dei pazienti portatori della variante -346C.

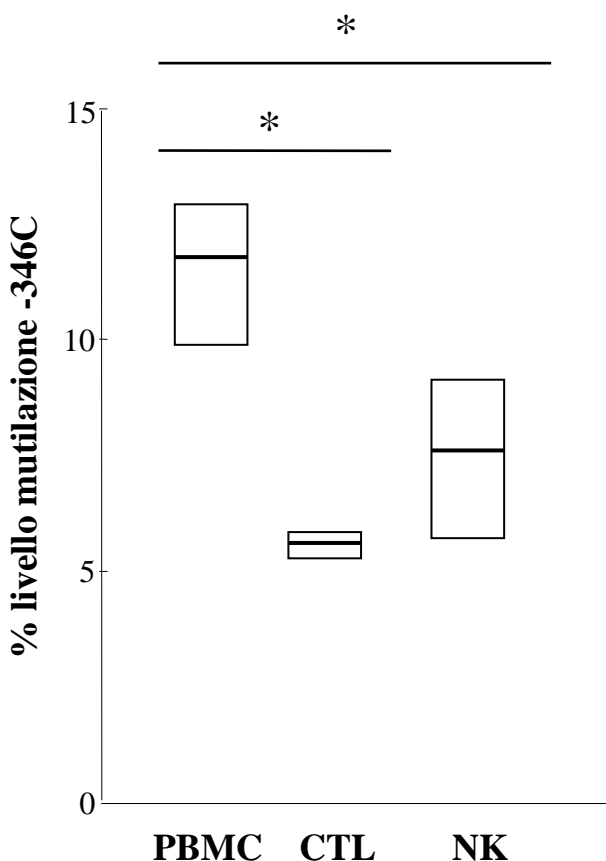


Figura 23

Metilazione allele -346C in soggetti maschi sani

Metilazione del DNA a livello dello SNP -346C>T. Le cellule sono state purificate con la tecnica delle Rosette.

Il livello di metilazione è espresso come valore medio e intervallo di interquartile della proporzione relativa delle C metilate non-convertite rispetto alle C metilate convertite.

La linea orizzontale indica il valore medio, il box-plot l'intervallo di interquartile.

Analisi statistica con test U di Mann-Whitney.

(*p<0.05).

Al fine di valutare se alla differenza di espressione del mRNA di SAP corrispondesse una analoga differenza di espressione della proteina, è stato condotto un saggio di western blotting su lisati totali di PBMC di soggetti maschi sani di controllo (-346C n=10, -346T n=10) tenuti in coltura con PHA+10U IL-2 per cinque giorni. Come mostrato in Figura 24, i portatori dell'allele -346T esprimevano livelli di SAP significativamente più alti rispetto ai portatori dell'allele -346C (p=0.02).

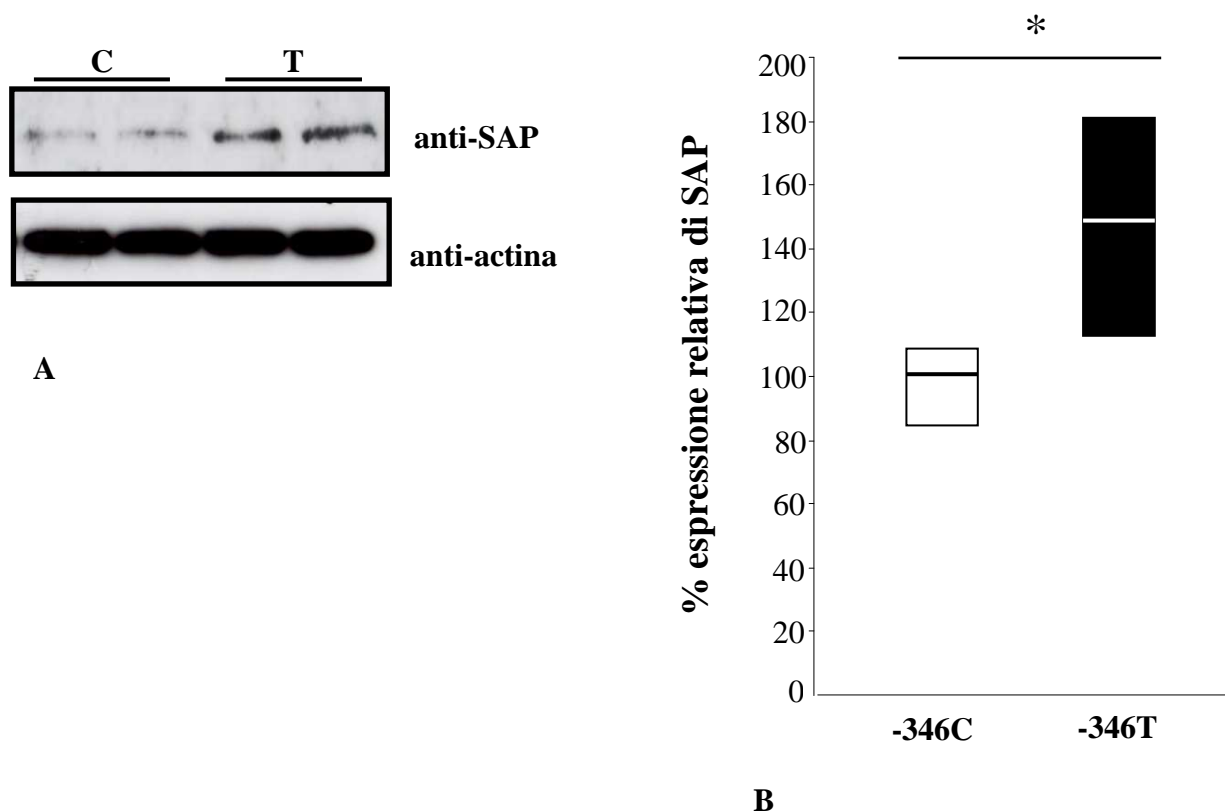


Figura 24

Espressione della proteina SAP in PBMC di soggetti maschi sani

PBMC da soggetti maschi sani (-346C: n=10; -346T: n=10) sono stati coltivati con PHA e IL-2.

(A) L'espressione di SAP è valutata in western blotting. L'mAb anti-SAP riconosceva una banda a 17 kDa; la normalizzazione è stata effettuata con un mAb anti-actina (45kDa).

(B) L'istogramma mostra l'analisi densitometrica della espressione proteica di SAP in PBMC: la mediana dell'espressione proteica relativa all'allele -346C è posta uguale a 100%; la linea orizzontale indica il valore medio, il box-plot l'intervallo di interquartile. Analisi statistica con test U di Mann-Whitney (*p<0.05).

I soggetti portatori dell'allele -346T mostrano una minore secrezione di IFN- γ

Al fine di valutare il ruolo del polimorfismo -346C>T nell'attivazione dei linfociti T, è stata analizzata la proliferazione cellulare e la produzione di citochine (IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17) in PBMC di soggetti maschi sani di controllo dopo nove giorni di coltura con PHA+IL2 per aumentare l'espressione di SLAM. Dopo questa coltura le cellule sono state attivate con un anticorpo anti-CD3 in presenza e assenza di un anticorpo anti-SLAM (-346C n=8, -346T n=8). I risultati ottenuti dal saggio di proliferazione hanno dimostrato che l'anticorpo anti-SLAM aumentava la proliferazione cellulare, ma senza sostanziali differenze tra i due gruppi di donatori (Figura 25B).

Al contrario, come mostrato in Figura 25A, i portatori dell'allele -346T producevano una minore quantità di IFN- γ rispetto ai portatori dell'allele -346C in seguito della stimolazione del CD3 sia in assenza (mediana [range interquartile]: 3.1 ng/ml [1.6-4.2]; 8 ng/ml [11.3-4.9]; p=0.01) sia in presenza (mediana, [intervallo di mediana]: 3.6 ng/ml [1.9-4]; 6.8 ng/ml [10.2-5]; p=0.02) della stimolazione di SLAM (Figura 25B). Viceversa i livelli delle altre citochine non presentavano differenze significative tra i due gruppi di donatori (dato non mostrato).

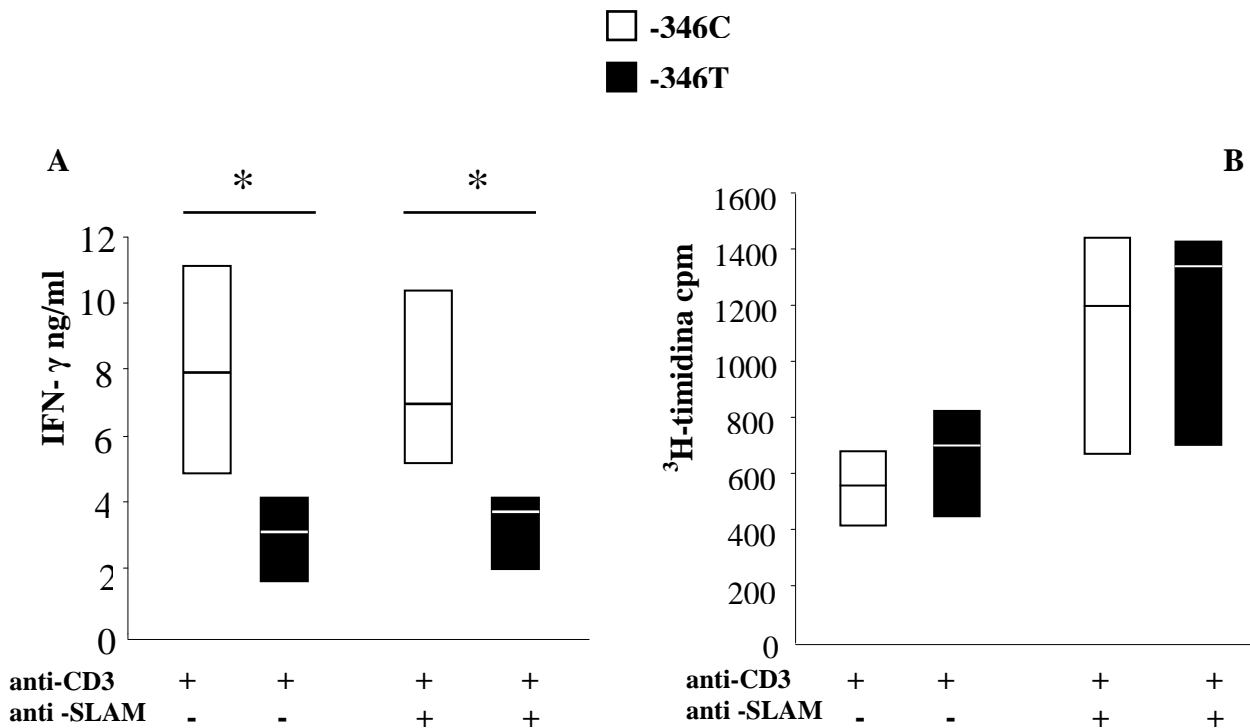


Figura 25

Produzione di IFN- γ e proliferazione delle cellule T in soggetti maschi sani

PBMC di soggetti sani di controllo (-346C: n=8; -346T: n=8) sono stati coltivati in presenza di PHA e IL-2. Dopo 9 giorni, le cellule sono state stimulate con un mAb anti-CD3 per tre giorni con e senza un mAb anti-SLAM. E' stata valutata la secrezione di IFN- γ (A) e la proliferazione cellulare (B). La linea orizzontale rappresenta il valore medio, il box-plot l'intervallo di interquartile. Analisi statistica con test U di Mann-Whitney (*p<0.05).

Materiali e Metodi

Sezione3

Pazienti

Sono stati analizzati 27 pazienti affetti da ALPS (15 maschi, 12 femmine) e 24 pazienti con DALD (16 maschi, 8 femmine) provenienti dal Dipartimento di Pediatria dell'Università di Torino e 534 soggetti sani come controllo. La diagnosi della malattia è stata effettuata secondo i criteri indicati nel ALPS NIH International Workshop [118]. I genitori di alcuni pazienti sono stati utilizzati per effettuare una analisi genotipica.

Sono stati analizzati anche 386 pazienti (229 maschi, 157 femmine) affetti da Sclerosi Multipla arruolati dal centro Sclerosi Multipla dell'Università del Piemonte Orientale di Novara.

Tutti i pazienti e i controlli erano italiani di origine caucasica e non imparentati tra loro. I prelievi di sangue periferico sono stati ottenuti da pazienti e controlli dopo loro consenso informato. Lo studio è stato effettuato secondo le linee guida del comitato etico locale.

Cellule

Cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state isolate da sangue mediante separazione su gradiente di Ficoll (Lympholyte-H, Cedarlane Laboratories, Olanda). Per valutare l'espressione di SAP e la metilazione di -346C, PBMC sono stati stimolati con 1µg/ml di PHA (Sigma-Aldrich) in terreno RPMI 1640 addizionato 1% L-Glutammina, 1X Antibiotici e 10% FBS in presenza di 10U/ml IL-2 (Sigma-Aldrich). Dopo 3-5 giorni di coltura, cellule CD16⁺ (NK), CD8⁺ (CTL) e CD4⁺(T_H), sono state purificate positivamente con biglie magnetiche (Miltenyi Biotec, GmbH, Germania) e analizzate per l'espressione di SAP. In alcuni esperimenti, linfociti T CD8⁺ e cellule NK CD56⁺ sono stati purificati negativamente da PBMC mediante il kit RosetteSep[®] Human CD8⁺T Cell Enrichment Cocktail e il kit RosetteSep[®] Human NK Cell Enrichment Cocktail (Stem Cell technologies, Vancouver, Canada). In entrambe le purificazioni, le cellule sono state messe in coltura come descritto sopra.

Per valutare la proliferazione cellulare dei PBMC, le cellule sono state stimolate con PHA (1µg/ml, Sigma) e IL-2 (2U/ml, Sigma) al fine di aumentare l'espressione del recettore SLAM. Dopo 9 giorni di coltura, le cellule sono state attivate per 72 ore con un mAb anti-CD3 (OKT3: 1µg/ml) in presenza/assenza di un mAb anti-SLAM (1 µg/ml, BioLegend, San Diego, CA).

La proliferazione è stata valutata mediante l'aggiunta, durante le ultime sei ore di coltura, di 0.5 µCi/pozzetto di timidina triziata ³H-TdR (Amersham Biosciences, GmbH, Friburgo, Germania) in tutti i pozzetti. Le cellule sono state analizzate al contatore-β (Wallac-Perkin Elmer, Boston MA, USA). Ogni saggio è stato effettuato in quadruplicato.

Amplificazione del DNA e ricerca di variazioni nel gene SH2D1A

La regione del DNA corrispondente al promotore, i quattro esoni con le regioni introniche adiacenti e il 3' UTR del gene *SAP* è stata amplificata mediante PCR e sottoposta ad analisi tramite sequenziamento diretto per cercare mutazioni e polimorfismi noti e non noti. I campioni sono stati sequenziati mediante Applied Biosystem 3100 Genetic Analyzer utilizzando il kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle-Sequencing (Applied Biosystem) dotato di dideossinucleotidi ciascuno legato ad un fluorocromo differente. Seguendo il protocollo consigliato dalla ditta, per un volume finale di reazione di 10 µl, sono stati addizionati al DNA purificato, 2 µl di BigDye Sequencing Buffer (in dotazione con il kit), l'oligonucleotide (3.2 µM/µl). La reazione di sequenziamento prevede l'utilizzo del seguente programma:

96°C 1'	1 ciclo
96°C 10''	} 25 cicli
50°C 5''	
60°C 4'	

Il prodotto della reazione è stato purificato, al fine di eliminare gli oligonucleotidi non incorporati, mediante il kit Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup (Millipore). 5 µl del purificato sono stati addizionati a 10 µl di formammide e denaturati (3 minuti a 95°C) e caricati su piastra ottica per la successiva analisi al sequenziatore.

Analisi della metilazione

I campioni sono stati trattati con bisolfito di sodio mediante il kit EZ DNA Methylation-Gold kit-Zymo Research (Irvine, CA) seguendo le indicazioni del produttore.

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 minuti, 64°C per 2.5 ore e mantenuta a 4°C per 1 ora. Il DNA trattato è stato purificato mediante colonna Zymo-Spin IC ed fluito in 10µl di M-Elution Buffer. I campioni sono conservati a -20°C. La regione contenente lo SNP di interesse è stato amplificata mediante PCR con specifici primer, uno dei quali biotinilato.

L'amplicone è stato sequenziato usando un Pyrosequencer PyroMark ID (Biotage AB and Biosystems, Uppsala, Svezia). La singola elica di DNA è stata isolata dalla reazione di PCR usando il Pyrosequencing Vacuum Prep Workstation (Biotage AB) e biglie di sefariosio-streptavidina (Streptavidin Sepharose TM High Performance beads (Amersham Bioscences, Arlington heights, IL) che legano il primer biotinilato. Un primer specifico è utilizzato per l'analisi in Real Time. Lo

SNP bersaglio è stato valutato convertendo il pirogramma in un valore numerico in relazione all'altezza del picco.

Real-Time RT-PCR

L'RNA totale dei PBMC è stato isolato mediante Trizol (Invitrogen). 500ng di RNA sono stati retrotrascritti con ThermoScript RT PCR System (Invitrogen). L'espressione di SAP è stata valutata con un saggio di espressione genica (SAP: saggio N° Hs00158978_m1; Applied Biosystem, Foster City, CA). Il gene GAPDH (saggio N° Hs99999905_m1) è stato usato per normalizzare la quantità di cDNA. La Real Time PCR, in duplicato per ciascun campione, è stata condotta nello strumento 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem). I risultati sono stati analizzati con il metodo con il metodo delle curve standard.

Western Blotting

Le cellule sono state lisate in un buffer di lisi (Tris-HCl 20 mM pH=8.0, NaCl 150mM, EDTA 5mM, NP-40 0.5%) contenente inibitori di proteasi (Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina, PMSF). I lisati proteici sono stati separati su un gel SDS-PAGE e trasferiti su un foglio di nitrocellulosa che è stata quindi incubata con un mAb anti-SAP (Upstate, Lake Placid, NY) e un mAb anti-actina (Sigma). La rivelazione degli anticorpi primari è stato effettuata con un mAb anti-Ig di topo coniugato con HRP (GE, Healthcare). Le bande sono state quantificate mediante un GelDoc EQ system (BioRad, Hercules, CA).

Quantificazione delle citochine

La concentrazione delle citochine è stata valutata nei surnatanti, dopo 72 ore di coltura: i livelli di IL-4 e IFN- γ sono stati misurati con il kit ELISA MAXTM Deluxe (BioLegend) mentre i livelli di IL-10 e IL-17 con il kit Human DuoSet (R&D System, Minneapolis, MN). I valori di assorbanza a 450 nm sono stati valutato mediante un lettore di micropiastre (Bio-Rad).

Analisi statistica

L'analisi statistica della distribuzione allelica e genotipica è stata calcolata con il test Chi-quadro applicando la correzione di Yates. Tutti i valori delle p sono stati assunti dal test a due code (cut-off $p < 0.05$). L'analisi dell'aplotipo è stata valutata con il programma Haploview (versione 3.11, Broad Institute di MIT e Harvard, 2003-2006). Questo programma è stato utilizzato, anche, per valutare il valore di linkage disequilibrium (LD) tra i diversi SNP.

La trasmissione allelica dalle mamme ai figli malati è stata valutata con il metodo AFBAC (Affected Family-BAsed Control) nel quale individuato un figlio affetto in una famiglia, gli alleli parentali non trasmessi al figlio malato sono usati come “alleli-controllo” mentre gli alleli parentali trasmessi sono usati come “alleli-caso”. L’analisi del Test di Trasmissione Disequilibrium (TDT) è stato effettuato con il software Haploview. L’uso di nuclei familiari in studi di associazione caso-controllo è stato sviluppato al fine di evitare errori etnici tra i pazienti e controlli scelti in modo casuale. I dati funzionali sono stati analizzati con il test U di Mann-Whitney ($p < 0.05$).

DISCUSSIONE

Sezione3

Questi risultati dimostrano che la variazione -346C>T del gene *SAP* è associata con ALPS e DALD nei soggetti di sesso maschile e suggeriscono che questa associazione sia legato alla possibilità di metilare la variante -346C, ma non quella -346T di questo SNP. Questo può influenzare i livelli di espressione della proteina *SAP* e quindi la funzionalità di recettori che si servono di questo trasduttore del segnale, probabilmente appartenenti alla famiglia SLAM, e quindi anche la risposta linfocitaria a stimoli di attivazione.

In particolare, i maschi affetti da ALPS o DALD mostrano una frequenza più elevata dell'allele -346T; questo allele non è metilabile e la sua presenza si associa ad una espressione più elevata di *SAP* nelle cellule NK e nei linfociti T CD8⁺ e ad una minore secrezione di IFN- γ in seguito all'attivazione linfocitaria.

Questi dati confermano i risultati ottenuti su un ceppo mutante spontaneo derivato da topi *MRLlpr/lpr*, nel quale l'inserzione di una adenina nel 21° codone di *SAP* (esone 1) causa uno slittamento nella cornice di lettura con una diminuzione nell'espressione della proteina, cui consegue una attenuazione dei principali parametri di malattia, ovvero ipergammaglobulinemia, livelli di autoanticorpi, espansione dei linfociti DNT, linfadenopatia e splenomegalia, glomerulonefrite e vasculite [128]. Questo dato ha suggerito una relazione epistatica opposta tra i difetti del recettore Fas e quelli di *SAP*.

L'associazione dell'allele -346T con lo sviluppo di ALPS/DALD sembra in parte supportata dalla analisi della trasmissione allelica dalle madri ai figli affetti in quanto l'allele di suscettibilità -346T sembra essere preferenzialmente trasmesso rispetto all'allele -346C; i dati ottenuti non erano statisticamente significativi dato il piccolo numero di soggetti analizzati.

Nella popolazione esaminata sono stati identificati tre SNP, tutti in *linkage disequilibrium* tra loro; in particolare, le variazioni -346C>T e -631A>G, significativamente associate con ALPS/DALD, mostravano un LD quasi assoluto (D' 0.96, r^2 0.8).

L'associazione più forte con l'ALPS/DALD è mostrata dalla variazione -346C>T, la cui variante -346C era un potenziale sito di metilazione, trovandosi in un sito ricco di isole CpG, come proposto dalla letteratura [137] e comprovato dalla nostra analisi in vivo.

Tuttavia, l'associazione tra l'allele -346T e la malattia sembra riguardare soltanto i pazienti maschi, che presentano una frequenza della variazione significativamente più alta rispetto alle femmine. Questo risultato potrebbe essere dovuto ad un diverso utilizzo del sito di metilazione -346C o di altri siti regolatori tra i soggetti di sesso maschile o femminile oppure ad una diversa influenza di fattori di genere. Dal punto di vista delle differenze di genere, è degno di nota quanto osservato da Maric e coll. [138], i quali hanno descritto che i linfonodi dei pazienti maschi affetti da ALPS

presentano frequentemente aspetti istopatologici di istiocitosi dei seni che invece sono rari nelle pazienti femmine.

La proteina SAP comprende due domini funzionali; il primo è un dominio SH2 mentre il secondo dominio è costituito da una corta coda di 28 aminoacidi all'estremità C-terminale che presenta due tirosine fosforilabili.

SAP può legare, grazie al suo dominio SH2, una regione citoplasmatica presente sui recettori SLAM caratterizzata da tre motivi consensus [75]; SAP lega questa regione con alta affinità e impedisce l'interazione con la tirosina-fosfatasi SHP-2. Il secondo dominio, invece, può legare la tirosina chinasi Fyn, che è richiesta per l'attivazione di SLAM [80-95].

Questi segnali sembrano svolgere un ruolo importante nello sviluppo dell'autoimmunità e della linfadenopatia nel topo MRL*lpr/lpr*; infatti, i linfociti T portatori del carattere *lpr* mostrano una maggiore attivazione di Fyn che suggerisce un ruolo di questa chinasi nella sopravvivenza anormale di queste cellule [99].

Inoltre, l'induzione di un deficit di Fyn in questi animali determina una riduzione della linfadenopatia e della produzione di autoanticorpi [100], che mima l'effetto prodotto dal deficit di SAP.

ALPS e la DALD presentano un quadro clinico simile e una ridotta funzionalità del recettore Fas, ma si distinguono per l'espansione dei linfociti DNT che sono presenti soltanto nell'ALPS.

Questa differenza è importante da un punto di vista diagnostico dato che la ricerca dei linfociti DNT è la prima analisi di laboratorio per la diagnosi dell'ALPS. Questa differenza può però anche indicare una differenza immunopatologica tra ALPS e DALD dal momento che i linfociti DNT sembrano svolgere un ruolo patogenetico importante nello sviluppo dell'ALPS.

Nonostante queste differenze, questo lavoro su *SAP* e precedenti lavori su *OPN* e *PRF1* indicano che il background genetico predisponente per ALPS e DALD abbia molti aspetti simili dato che variazioni in questi geni predispongono allo sviluppo di entrambe le malattie.

I lavori precedenti suggerivano che le variazioni di *PRF1* e *OPN* potessero agire insieme al difetto di Fas nello sviluppo di ALPS e DALD alterando meccanismi di spegnimento della risposta immunitaria alternativi a Fas, ovvero l'apoptosi indotta da riattivazione dei linfociti (AICD), inibita dalla osteopontina, e il fratricidio delle cellule immunitarie attivate, inibita dalla carenza di perforina [82-127-139].

In questo quadro l'effetto predisponente dell'allele -346T potrebbe essere legato alla minore secrezione di IFN- γ associata a questo allele; infatti questa citochina è capace di aumentare l'espressione di FasL nei linfociti T helper, per cui una sua ridotta secrezione potrebbe peggiorare il difetto funzionale di Fas dei pazienti [140]. Viceversa, l'effetto non è dovuto ad una azione diretta

diretta sull'AICD o sulla capacità di Fas di trasdurre il segnale apoptotico dal momento che non sono state osservate differenze in queste risposte nei linfociti dei portatori degli alleli -346C e -346T (dato non mostrato). Questo quadro è diverso da quello osservato nei pazienti XLP che mostrano un difetto nell'AICD e una normale apoptosi indotta da Fas [62].

I geni dei recettori della famiglia SLAM mappano sul cromosoma 1 e comprendono un gruppo di sette recettori transmembrana appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline: SLAM (CD150), 2B4 (CD244), CD84 (SLAMF5), CD48, NTBA (SLAMF6 o Ly108 nel topo), Ly9 (CD229) e CRACC (CD319) [75-76-103-107]. Molti membri della famiglia SLAM mediano interazioni omotipiche; tuttavia, 2B4 (recettore di attivazione nelle cellule NK e linfociti T CD8⁺) lega CD48 la cui espressione è incrementata dalla infezione da EBV. Probabilmente, i pazienti affetti da XLP mostrano un difetto nella risposta alle infezioni da EBV per un deficit della citotossicità mediata dal recettore 2B4.

Nei nostri pazienti l'effetto predisponente di -346T non sembra attribuibile a una diminuzione della citotossicità cellulo-mediata, poiché questa variazione si associa con un aumento dell'espressione di SAP e quindi dovrebbe supportare la funzione citotossica [141].

I nostri dati non hanno mostrato differenze nell'attività NK in vitro, sia basale sia dipendente da 2B4, tra i portatori delle due varianti di -346C/T (dati non mostrati). Tuttavia non si può escludere che la ridotta produzione di IFN- γ osservata nei portatori di -346T possa causare in vivo una ridotta attività citotossica, normalmente sostenuta da questa citochina nella risposta immunitaria.

Il coinvolgimento di SAP nell'autoimmunità potrebbe andare oltre al caso particolare di ALPS e DALD. Infatti è stato descritto che il difetto di SAP potrebbe anche proteggere i topi dallo sviluppo della EAE (Encefalomielite Autoimmune Sperimentale, modello animale della sclerosi multipla) e del LES [77].

Tuttavia, il nostro lavoro indica che la variazione -346C>T non sembra essere coinvolta nella Sclerosi Multipla (SM), in quanto non è stata riscontrata nessuna associazione tra questa variazione e la malattia. Questo risultato è differente rispetto ai dati ottenuti con le variazioni di *OPN* e *PRF1* che mostravano una associazione non solo con ALPS e DALD, ma anche con Sclerosi Multipla [127-135-142-143-144].

In conclusione, questo lavoro suggerisce che elevati livelli di espressione di SAP possano favorire la linfoproliferazione nei pazienti affetti da ALPS e DALD confermando i dati osservati nei topi *MRLlpr/lpr*. E' pertanto possibile suggerire che una parziale inibizione farmacologica di SAP potrebbe in futuro essere utile per il controllo della malattia.

CONCLUSIONI GENERALI DELLA TESI

Questa tesi ha mostrato che variazioni nei geni di XIAP, Munc13-4 e SAP possono agire come fattori modificatori per lo sviluppo di ALPS e DALD e si affiancano ai dati precedenti che dimostravano un effetto simile per variazioni di *PRF1*. ALPS e DALD sono malattie geneticamente eterogenee e in differenti famiglie possono essere coinvolti diversi fattori genetici che si affiancano al difetto principale, responsabile della ridotta funzione di Fas. I dati presentati in questa tesi indicano che un ruolo chiave in questa azione modificatrice può essere svolta da fattori coinvolti nella citotossicità cellulo-mediata svolta da cellule NK e CTL e nello sviluppo di malattie linfoproliferative diverse da ALPS e DALD, quali FHL e XLP. Infatti variazioni di *PRF1* e *UNC13D*, coinvolte nello sviluppo di FHL2 e FHL3, e di *XIAP*, coinvolte nello sviluppo di XLP2, sembrano poter influire sullo sviluppo di ALPS o DALD. In parte diverso è invece il caso di *SAP* le cui mutazioni deleterie causano lo sviluppo di XLP1, mentre lo sviluppo di ALPS e DALD sembra essere favorita da varianti geniche associate ad una maggiore espressione della proteina.

BIBLIOGRAFIA

1. Goldsby R., A., Kindt T., J., Osborne B., A. (2005) *Kuby 2/e*, 473-521
2. Griffith T., S., Ferguson T., A. (2011) *Immunity* **35**, 456-466
3. Steinman R., M., Hawiger D., Nussenzweig M., C. (2003). *Annu Rev Immunol* **21**, 685-711
4. Bour-Jordan H., Esensten J., H., Martinez-Llordella M., Penaranda C., Stumpf M., Bluestone J., A. (2011) *Immunol Rev* **241**, 180-205
5. Howard L., M., Kohm A., P., Castaneda C., L., Miller S., D. (2005) *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**, 205-216
6. Brenner D., Krammer P., H., Arnold R. (2008) *Oncology Ematology* **66**, 52-64
7. Mateo V., Menager M., Saint-Basile G., Stoizenberg M., C., Roquelaure B., André N., Florkin B., Deist F., Picard C., Fischer A., Rieux-Laucat F. (2007) *Blood* **110**, 4285-4292
8. Harper N., Hughes M., MacFarlane M., Cohen G., M. (2003) *J Biol Chem* **278**, 25534-25541
9. Dianzani U., Chiocchetti A., Ramenghi U. (2002) *Life Sciences* **72**, 2803-2824
10. Nagata S. (1997) *Cell* **88**, 355-365
11. Naismith J., H., Sprang S., R. (1998) *Trends Biochem Sci* **23**, 74-79
12. Lynch D., H., Ramsdell F., Alderson M., R. (1995) *Immunology Today* **16**, 569-574
13. Worth A., Thrasher A., J., Gaspar H., B. (2006) *Br J Haematol* **133**, 124-140
14. Takahashi T., Tanaka M., Inazawa J., Abe T., Suda T., Nagata S. (1994) *Int Immunol* **6**, 1567-1574
15. Nagata S., Golstein P. (1995) *Science* **267**, 1449-1456
16. O'Connell J., Bennett M., W., O'Sullivan G., C., Collins J., K., Shanahan F. (1999) *Immunol Today* **20**, 46-52
17. Cho S., C., Choi E., J. (2002) *J Biochem Mol Biol* **35**, 24-27
18. Los M., Stroh C., Janicke R., U., Engels I., H., Schulze-Osthoff K. (2001) *Trends Immunol* **22**, 31-34
19. Wang L., Yang J., K., Kabaleeswaran V., Rice A., J., Cruz A., C., Park A., Y., Yin Q., Damko E., Jang S., B., Raunser S., Robinson C., V., Siegel R., M., Walz T., Wu H. (2010) *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1324-1329
20. Desagher S., Osen-Sand A., Montessult S., Magnenat E., Vilbois F., Hochmann A., Journot L., Antonsson B., Martinou J., C. (2001) *Mol Cell* **8**, 601-611
21. Pop C., Timmer J., Sperandio S., Salvesen G., S. (2006) *Mol Cell* **22**, 269-275
22. Riedl S., J., Salvesen G., S. (2007) *Nature* **8**, 405-413
23. Nishida K., Yamaguchi O., Otsu K. (2008) *Circ Res* **103**, 343-351

24. Johnson C., R., Jarvis W., D. (2004) *Apoptosis* **9**, 423-427
25. Chun H., J., Zheng L., Ahmad M., Wang J., Speirs C., K., Siegel R., M., Dale J., K., Puck J., Davis J., Hail C., G., Skoda-Smith S., Atkinson T., P., Straus S., E., Lenardo M., J. (2002) *Nature* **419**, 395-399
26. Falk M., Ussat S., Reiling N., Wesch D., Kabelitz D., Klages S., A. (2004) *J Immunol* **173**, 5077-5085
27. Algeciras-Schimmich A., Barnhart B., C., Peter M., E. (2002) *Curr Opin Cell Biol* **14**, 721-726
28. Schwerk C., Osthoff K., S. (2003) *Biochem Pharmacol* **66**, 1453-1458
29. Launay S., Hermine O., Fontenay M., Kroemer G., Solary E., Garrido C. (2005) *Oncogene* **24**, 5137-5148
30. Droin N., Cathelin S., Jacquelin A., Guery L., Garrido C., Fontenay M., Hermine O., Solary E. (2008) *Biochem Pharmacol* **90**, 416-422
31. D'Agnillo F., Alayash A. (2001) *Blood* **98**, 3315-3323
32. Lamkanfi M., Festjens N., Declercq W., Berghe T., V., Vandenabeele P. (2007) *Nature* **14**, 44-55
33. Castedo M., Perfettini J., L., Roumier T., Kroemer G. (2002) *Nature* **9**, 1287-1293
34. Scaffidi C., Volkland J., Blomberg I., Hoffmann I., Krammer P., H., Peter M. (2000) *J Immunol* **164**, 1236-1242
35. Park M., A., Li J., T., Hagan J., B., Maddox D., E., Abraham R., S. (2008) *Lancet* **372**, 489-502
36. Chiocchetti A., Dianzani U. (2001) *Res. Adv. In Blood*
37. Gross A., McDonnell J., M., Korsmeyer S., J. (1999) *Genes Dev* **13**, 1899-1911
38. Fukuda M. (2008) *Cell Mol Life Sci* **65**, 2801-2813
39. Engel P., Eck M., J., Terhorst C. (2003) *Nat Rev Immunol* **3** 813-821
40. Deveraux Q., L., Roy N., Stennicke H., R., Van Arsdale T., Zhou Q., Srinivasula S., M., Alnemri E., S., Salvesen G., S., Reed J., C. (1998) *EMBO J* **17**, 2215-2223
41. Roy N., Deveraux Q., L., Takahashi R., Salvesen G., S., Reed J., C. (1997) *EMBO J* **16**, 6914-6925
42. Dohi T., Okada K., Xia F., Wilford C., E., Samuel T., Welsh K., Marusawa H., Zou H., Armstrong R., Matsuzawa S., Salvesen G., S., Reed J., C., Altieri D., C. (2004) *J Biol Chem* **279**, 34087-34090
43. Lagace M., Xuan J., Y., Young S., S., McRoberts C., Maier J., Rajcan-Separovic E., Korneluk R., G., (2001) *Genomics* **77**, 181-188

44. Duckett C., S., Nava V., E., Gedrich R., W., Clem R., J., Van Dongen J., L., Gilfillan M., C., Shiels H., Hardwick J., M., Thompson C., B. (1996) *EMBO J* **15**, 2685-2694
45. Huang Y., Park Y., C., Rich R., L., Segal D., Myszka D., G., Wu H. (2001) *Cell* **104**, 781-790
46. Sun C., Cai M., Meadows R., P., Xu N., Gunasekera A., H., Herrmann J., Wu J., C., Fesik S., W. (2000) *J Biol Chem* **275**, 33777-33781
47. Datta R., Oki E., Endo K., Biedermann V., Ren J., Kufe D. (2000) *J Biol Chem* **275**, 31733-31738
48. van Loo G., Saelens X., Matthijssens F., Schotte P., Beyaert R., Declercq W., Vandenabeele P. (2002) *Cell Death Differ* **9**, 1207-1211
49. Wu G., Chai J., Suber T., L., Wu J., W., Du C., Wang X., Shi Y. (2000) *Nature* **408**, 1008-1012
50. MacFarlane M., Merrison W., Bratton S., B., Cohen G., M. (2002) *J Biol Chem* **277**, 36611-36616
51. De Saint Basile G., Menaschè G., Fischer A. (2010) *Nature* **11**, 568-579
52. Huppa J., B., Davis M., M. (2003) *Nat Rev Immunol* **3**, 973-983
53. Feldmann J., Callebaut I., Raposo G., Certain S., Bacq D., Dumont C. (2003) *Cell* **115**, 461-473
54. Shirakawa R., Higashi T., Tabuchi A., Yoschioka A., Nischioka H., Horiuchi H. (2004) *J Biol Chem* **11**, 10730-10737
55. Yi Z., Yokota H., Torii S., Aoki T., Hosaka M., Zhao S., Takata K., Takeuchi T., Izumi T. (2002) *Mol Cell Biol* **22** 1858-1867
56. Tsuboi T., Fukuda M. (2006) *J Cell Sci* **119**, 2196-2203
57. Neef M., Wieffer M., Jong A., Negroiu G., Metz C., van der Sluijs P. (2005) *Mol Biol Cell* **16**, 731-741
58. Menager M., Menasche G., Romao M., Knapnougel P., Hsuan Ho C., Saint Basile G. (2007) *Nat Immunol* **8**, 257-267
59. Lee M., Mishra A., Lambright D. (2009) *Traffic* **10**, 1377-1389
60. Zerial M., McBride H. (2001) *Mol Cell Biol* **2**, 107-119
61. Goishi K., Mizuno K., Nakanishi H., Sasaki T. (2004) *Biochem Biophys Res Commun* **324**, 294-301
62. Wood S., Meeths M., Chiang S., Bechensteen A., Boelens Bryceson Y. (2009) *Blood* **114**, 4117-4127
63. Hong W. (2005) *Science* **15**, 644-650

64. Izumi T., Gomi H., Kasai K., Mizutani S., Torii S. (2003) *Cell Biology* **28**, 465-474
65. Fukuda M. (2003) *J Biol Chem* **278**, 15390-15396
66. Fukuda M., Kanno E., Saegusa C., Ogata Y., Kuroda T. (2002) *J Biol Chem* **277**, 39673-39678
67. Koch H., Hofmann K., Brose N. (2000) *Biochem J* **349**, 247-253
68. Pivot-Pajot C., Varoquaux F., Saint Basile G., Bourgoin S. (2008) *J Immunol* **180**, 6786-6797
69. Bromley S., K., Iaboni A., Davis S., J., Whitty A., Green J., M., Shaw A., S., Weiss A., Dustin M., L. (2001) *Nat Immunol* **2**, 1159-1166
70. Jacobelli J., Andres P., G., Boisvert J., Krummel M., F. (2004) *Curr Opin Immunol* **16**, 345-352
71. Varma R., Campi G., Yokosuka T., Saito T., Dustin M., L. (2006) *Immunity* **25**, 117-127
72. Minguet S., Swamy M., Alarcon B., Luescher I., F., Schamel W., W. (2007) *Immunity* **26**, 43-54
73. Schmitz M., L., Bacher S., Dienz O. (2003) *Faseb J* **17**, 2187-2193
74. Howie D., Okamoto S., Rietdijk S., Clarke K., Wang n., Gullo C., Bruggerman J., P., Manning S., Coyle A., j., Greenfield E., Kuchroo V., Terhorst C. (2002) *Blood* **100**, 2899-2907
75. Poy F., Yaffe M., B., Sayos J., Saxena K., Morra M., Sumegi J., Cantley L., C., Terhorst C., Eck M., J. (1999) *Mol Cell* **4** 555-561
76. Detre C., Keszei M., Romero X., Tsokos G., C., Terhorst C. (2010) *Semin Immunopathol* **32** 157-171
77. Chan A., Y., Westcott J., M., Mooney J., M., Wakeland E., K., Schatzle J., D. (2006) *Opin Immunol* **18** 656-664
78. Ma C., S., Nichols K., E., Tangye S., G. (2007) *Annu Rev Immunol* **25** 337-379
79. Howie D., Simarro M., Sayos J., Guirado M., Rancho J., Terhosrt C. (2002) *Blood* **99** 957-965
80. Latour S., Veillette A. (2003) *Immun Rev* **192** 212-224
81. Kim J., R., Mathew S., O., Patel R., K., Pertusi R., M., Mathew P., A. (2010) *Clin Exp Immunol* **160**, 348-358
82. Clementi R., Chiocchetti A., Cappellano G., Cerutti E., Ferretti M., Orilieri E., Dianzani I., Ferrarini M., Bregni M., Danesino C., Bozzi V., Putti MC., Cerutti F., Cometa A., Cometa A., Locatelli F., Maccario R., Ramenghi U., Dianzani U. (2006) *Blood* **108** 3079-3084
83. Veillette A. (2006) *Nat Rev Immunol* **6** 56-66

84. Schwartzberg P., L., Mueller K., L., Qi H., Cannons J., L. (2009) *Nat Rev Immunol* **9** 39-46
85. Bottino C., Augugliaro R., Castriconi R., Nanni M., Biassoni R., Moretta L., Moretta A. (2000) *Eur J immunol* **30**, 3718-3722
86. Bouchon A., Celia M., Grierson H., L., Cohen J., I., Colonna M. (2001) *J Immunol* **167**, 5517-5521
87. Veillette A. (2010) *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a002469
88. Griewank K., Borowski C., Rietdijk S., Wang N., Julien A., Wie D., G., Mamchak A., A., Terhorst C., Bendelac A. (2007) *Immunity* **27**, 751-762
89. Nanda N., Andre P., Bao M., Clauser K., Deguzman F., Howie D., Conley P., B., Terhorst C., Phillips D., R. (2005) *Blood* **106**, 3028-3034
90. Sidorenko S., P., Clark E., A., (1993) *J Immunol* **151**, 4614-4624
91. Veillette A., Dong Z., Latour S. (2007) *Immunity* **27**, 698-708
92. Calpe S., Erdos E., Liao G., Wang N., Rietdijk S., Simarro M., Scholtz B., Mooney J., Lee C., H., Shin M., S. (2006) *Immunogenetics* **58**, 15-25
93. Veillette A. (2004) *J Exp Med* **199**, 1175-1178
94. Morra M., Silander O., Calpe S., Choi M., Oettgen H., Myers L., Etzioni A., Buckley R., Terhorst C. (2001) *Blood* **98** 1321-1325
95. 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. (2004) *Immunity* **21**, 693-706
96. Nunez-Cruz S., Yeo W., C., Rothmann j., Ojha P., Bassiri H., Juntilla M., Davidson D., Veillette A., Koretzky G., A., Nichols K., E. (2008) *J Immunol* **181**, 2311-2320
97. Qi H., Cannons J., L., Klauschen F., Schwartzberg P., L., Germain R., N. (2008) *Nature* **455**, 764-769
98. Balomenos D., Rumold R., Theofilopoulos A., N. (1997) *J Immunol* **159**, 2265-2273
99. Katagiri T., Urakawa K., Yamanashi Y., Semba K., Takahashi T., Toyoshima K., Yamamoto T., Kano K. (1989) *Proc Natl Acad Sci* **86**, 10064-10068
100. Takahashi T., Yagi T., Kakinuma S., Kurokawa A., Okada T., Takatsu K., Aizawa S., Katagiri T. (1997) *J Immunol* **159**, 2532-2541
101. 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. (2002) *EMBO J* **21**, 314-323
102. Nichols K., E., Ma C., S., Cannons J., L., Schwartzberg P., L., Tangye S., G. (2005) *Immunol Rev* **203**, 180-199
103. Furukawa H., Tohma S., Kitazawa H., Komori H., Nose M., Ono M. (2010) *Arch Immunol* **58**, 37-44

104. Sanzone S., Zeyda M., Saemann MD., Soncini M., Holter W., Fritsch G., Knapp W., Condotti F., Stulnig TM., Parolini O. (2003) *J Biol Chem* **278**, 29593-29599
105. Davidson D., Shi X., Zhang S., Wang H., Nemer M., Ono N., Ohno S., Yanagi Y., Veillette A. (2004) *Immunity* **21**, 707-717
106. Eastwood D., Gilmour K., C., Nistala K., Meaney C., Chapel H., Sherrell Z., Webster A., D., Davies E., G., Jones A., Gaspar H., B. (2004) *Clin Exp Immunol* **137**, 584-588
107. Chan A., Y., Westcott J., M., Mooney J., M., Wakeland E., K., Schatzle J., D. (2006) *Curr Opin Immunol* **18**, 656-664
108. Delogu L., G., Deidda S., Delitala G., Manetti R. (2011) *J Infect Dev Ctries* **5**, 679-687
109. Kuijff M., L., Godschalk P., C., Gilbert M., Endtz H., P., Tio-Gillen A., P., Ang C., W., van Doorn P., A. (2007) *J Neuroimmunol* **2**, 69-73
110. Tsonis I., A., Avrameas S. (2007) *J Autoimmun* **29**, 203-205
111. Grant S., F., Qu H., Q., Bradfield J., P., Marchand L., Kim C., E., Glessner J., T., Grabs R., Taback S., P., Frackelton E., C., Eckert A., W., Annaiah K., Lawson M., L., Otieno F., G., Santa E., Shaner J., L., Smith R., M., Skraban R., Imielinski M., Chiavacci R., M., Grundmeier R., W., Stanley C., A., Kirsch S., E., Waggott D., Paterson A., D., Monos D., S., DCCT/EDIC Research Group., Polychronakos C., Hakonarson H. (2009) *Diabetes* **58**, 290-295
112. Plenge R., M, Cotsapas C., Davies L., Price A., L., de Bakker P., I., Maller J., Pe'er I., Burt N., P., Blumenstiel B., DeFelice M., Parkin M., Barry R., Winslow W., Healy C., Graham R., R., Neale B., M., Izmailova E., Roubenoff R., Parker A., N., Glass R., Karlson E., W., Maher N., Hafler D., A., Lee D., M., Seldin M., F., Remmers E., F., Lee A., T., Padyukov L., Alfredsson L., Cobyln J., Weinblatt M., E., Gabriel S., B., Purcell S., Klareskog L., Gregersen P., K., Shadick N., A., Daly M., J., Altshuler D. (2007) *Nat Genet* **39**, 1477-1482
113. Ramenghi U., Bonisconi S., Migliaretti G., DeFranco S., Bottarel F., Gambaruto C., DiFranco D., Priori R., Conti F., Dianzani I., Varesini G., Merletti F., Dianzani U. (2000) *Blood* **95**, 3176-3182
114. Rieux-Laucat F., Fischer A., Le Deist F. (2003) *Current Opinion in Immunology* **15**, 325-331
115. Drappa J., Vaishnav A., K., Sullivan K., E., Chu J., L., Elkon K., B. (1996) *The New England Journal of Medicine* **335**, 1643-1649
116. Rieux-Laucat F., Le Deist F., Fischer A. (2003) *Cell Death and Differentiation* **10**, 124-133
117. Chatinet A., M., Stolzenberg M., C., Loffredo M., S., Shaffner C., Ducrot N., Rieux-laucat F. (2009) *Blood* **113**, 3027-3030

118. Oliveira J., B., Bleesing JJ., Dianzani U., Fleisher TA., Jaffe ES., Lenardo MJ., Rieux-Laucat F., Siegel RM., Su HC., Teachey DT., Rao VK. (2010) *Blood*
119. Oliveira J., B., Ridere N., Niemela J., E., Zheng L., Sakai K., Nix C., P., Danner R., L., Barb J., Munson P., J., Puck J., M., Dale J., Straus S., E., Fleisher T., A., Lenardo M., J. (2007) *PNAS* **104**, 8953-8958
120. Kopecky O., Lukesova S. (2007) *InterNAtional JouRNAl of Immunogenetics* **34**, 225-229
121. Brandt D., Gershwin M., E. (2006) *Autoimmunity Rewiews* **5**, 465-470
122. Holzlova E., Vonarbourg C., Stolzenberg M., Arkwright P., D., Selz F., Prieur A., M., Blanche S., Bartunkova J., Vilmer E., Rieux-Laucat F. (2004) *The New England JouRNAl of Medecine* **351**, 409-418
123. Jackson C., E., Fischer R., E., Hsu A., P., Anderson S., M., Choi Y., Wang J., Dale J., K., Fleisher T., A., Middleton L., A., Sneller M., C., Lenardo M., J., Straus S., E., Puck J., M. (1999) *Am J Hum Gen* **64**, 1002-1014
124. Menasche G., Pastural E., Feldmann J., Certain S., Ersoy F., Dupuis S. (2000) *Nature Genetic* **25**, 173-176
125. Stepp S., Dufourcq-Lagelouse R., Le Deist F., Bhawan S., Certain S., Mathew P. (1999) *Science* **286**, 1957-1959
126. Gholam C., Grigoriadou S., Gilmour K., C., Gaspar H., B. (2011) *Clin Exp Immunol* **163**, 271-283
127. Chiocchetti A., Indelicato M., Bensi T., Mesturini R., Giordano M., Sametti S., Castelli L., Bottarel F., Mazzarino M., C., Garbarini L., Giacopelli F., Valesini G., Santoro C., Dianzani I., Ramenghi U., Dianzani U. (2004) *Blood* **103**, 1376-1382
128. Komori H., Furukawa H., Mori S., Ito MR., Terada M., Zhang MC., Ishii N., Sakuma N., Nose M., Ono M. (2006) *J Immunol* **176** 395-400
129. Rigaud S., Fondanèche M., C., Lambert N., Pasquier B., Mateo V., Soulas P., Galicier L., Le Deist F., Rieux-Laucat F., Revy P., Fischer A., de Saint Basile G., Latour S. (2006) *Nature* **444**, 110-114
130. Santoro A., Cannella S., Bossi G., Gallo F., Trizzino A., Pende D., Dieli F., Bruno G., Aricò M. (2006) *J Med Genet* **43**, 953-960
131. Rudd E., Bryceson Y., T., Zheng C., Edner J., Wood S., M., Ramme K., Gavhed S., Gürgey A., Hellebostad M., Bechensteen A., G., Ljunggren H., G., Fadeel B., Nordenskjöld M., Henter JI. (2008) *J Med Genet* **45**, 134-141
132. Zhang K., Biroshak J., Glass D., N., Thompson S., Finkel T., Passo M., H., Binstadt B., A., Filipovich A., Grom A., A. (2008) *Arthritis Rheum* **58**, 2892-2896

133. Sieni E., Cetica V., Santoro A., Beutel K., Mastrodicasa E., Meeths M., Ciambotti B., Brugnolo F., zur Stadt U., Pende D., Moretta L., Griffiths G., M., Henter J., I., Janka G., Aricò M. (2011) *J Med Genet* **48**, 343-352
134. Hazen M.,M., Woodward A.,L., Hofmann I., Degar B.,A., Grom A., Filipovich A.,H., Binstadt B.,A. (2008) *Arthritis Rheum* **58**, 567-570
135. Orilieri E., Cappellano G., Clementi R., Cometa A., Ferretti M., Cerutti E., Cadario F., Martinetti M., Larizza D., Calcaterra V., D'Annunzio G., Lorini R., Cerutti F., Bruno G., Chiocchetti A., Dianzani U. (2008) *Diabetes* **57**, 1078-1083
136. Vastert S., J., van Wijk R., D'Urbano L., E., de Vooght K., M., de Jager W., Ravelli A., Magni-Manzoni S., Insalaco A., Cortis E., van Solinge W., W., Prakken B., J., Wulffraat N., M., de Benedetti F., Kuis W. (2010) *Rheumatology* **49**, 441-449
137. Parolini O., Weinhäusel A., Kagerbauer B., Sassmann J., Holter W., Gadner H., Haas OA., Knapp W. (2003) *Immunogenetics* **55**, 116-121
138. Maric I., Pittaluga S., Dale JK., Niemela JE., Delsol G., Diment J., Rosai J., Raffeld M., Puck JM., Straus SE., Jaffe ES. *Am J Surg Pathol* (2005) **29**, 903-911
139. Boggio E., Indelicato M., Orilieri E., Mesturini R., Mazzarino M., C., Campagnoli M., F., Ramenghi U., Dianzani U., Chiocchetti A. (2010) *Haematologica* **95**, 1897-1904
140. Boselli D., Losana G., Bernabei P., Bosisio D., Drysdale P., Kiessling R., Gaston J., S., Lammas D., Casanova J., L., Kumararatne D., S., Novelli F. (2007) *Eur J Immunol* **37**, 2196-2204
141. Snow A., L., Marsh R., A., Krummey S., M., Roehrs P., Young L., R., Zhang K., van Hoff J., Dhar D., Nichols K., E., Filipovich A., H., Su H., C., Bleesing J., J., Lenardo M., J. (2009) *J Clin Invest* **119**, 2976-2989
142. Chiocchetti A., Comi C., Indelicato M., Castelli L., Mesturini R., Bensi T., Mazzarino M., C., Giordano M., D'Alfonso S., Momigliano-Richiardi P., Liguori M., Zorzon M., Amoroso A., Trojano M., Monaco F., Leone M., Magnani C., Dianzani U. (2005) *J Neuroimmunol* **163**, 172-178
143. D'Alfonso S., Barizzone N., Giordano M., Chiocchetti A., Magnani C., Castelli L., Indelicato M., Giacopelli F., Marchini M., Scorza R., Danieli M., G., Cappelli M., Migliaresi S., Bigliardo B., Sabbadini M., G., Baldissera E., Galeazzi M., Sebastiani G., D., Minisola G., Ravazzolo R., Dianzani U., Momigliano-Richiardi P. (2005) *Arthritis Rheum* **52**, 539-547
144. Cappellano G., Orilieri E., Comi C., Chiocchetti A., Bocca S., Boggio E., Bernardone I., S., Cometa A., Clementi R., Barizzone N., D'Alfonso S., Corrado L., Galimberti D., Scarpini

E., Guerini F., R., Caputo D., Paolicelli D., Trojano M., Figà-Talamanca L., Salvetti M., Perla F., Leone M., Monaco F., Dianzani U. (2008) *Genes Immun* **9**, 438-444

***ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI,
IN STAMPA,
O SOTTOMESSI PER LA PUBBLICAZIONE***

Tropical medicine rounds

Serum cytokine profile during *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer)

Elisa Zavattaro¹, MD, PhD, Riccardo Mesturini^{2,3}, PhD, Ange Dossou⁴, MD, Matteo Melensi^{2,3}, PhD, Roch Christian Johnson⁵, MD, PhD, Ghislain Sopoh⁴, MD, Umberto Dianzani^{2,3}, MD, PhD, and Giorgio Leigheb^{1,3}, MD

¹Dermatology Unit, Department of Clinical and Experimental Medicine, ²Immunology Unit, Department of Medical Sciences, ³Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases, "A. Avogadro" University of Piemonte Orientale, Novara, Italy, ⁴Centre de Dépistage et de Traitement de l'Ulcère de Buruli (CDTUB), Allada, and ⁵Programme National de Lutte contre l'Ulcère de Buruli et la Lèpre, Ministère de la Santé Publique, Cotonou, Benin

Correspondence

Prof. Giorgio Leigheb, MD
Dermatology Unit
Department of Clinical and Experimental Medicine
"A. Avogadro" University of Piemonte Orientale
Via Solaroli 17
Novara 28100
Italy
E-mail: dermo@maggioreosp.novara.it

Financial disclosure and conflicts of interest: none.

Background

Buruli ulcer (BU) is a severe disease caused by *Mycobacterium ulcerans* infection and characterized by polymorphic cutaneous lesions, ranging from small nodules to wide ulcers. It can also affect the subcutaneous tissues, muscles, joints, and bones, causing ankylosis and osteomyelitis. It is mainly distributed in sub-tropical areas, where it represents the third most common Mycobacteriosis after tuberculosis and leprosy. It mainly affects children and young adults with high incidence of severe secondary disabilities and mutilations, even after specific treatment.¹⁻³ Intriguingly, wide ulcerative lesions are not necessarily related to persistence of *M. ulcerans*, when adequate regimen of antibiotic therapy is precociously started. Even in these cases, cutaneous healing frequently

Abstract

Background Buruli Ulcer (BU) is a severe cutaneous and subcutaneous disease due to *Mycobacterium ulcerans* infection, mainly distributed in sub-Saharan Africa and tropical areas. The role of T helper (TH) cytokines in the development and clinical course of the disease has been previously studied by investigating the *in vitro* immune response of lymphocytes from affected patients and immunohistochemical analyses of biptic samples.

Methods TH cytokine levels (IFN γ , TNF- α , IL-2, IL-10, IL-4, IL-5, IL-17) were evaluated in serum of 34 Beninese subjects by cytofluorimetric and immunoenzymatic assays: 16 patients affected with active BU, 4 patients who had healed after specific therapy, and 14 matched controls.

Results Levels of IFN γ were higher in patients with late BU (>2 months from onset) and healed patients than in controls, and in ulcerative than in pre-ulcerative patients. Analysis of 4 patients with "late" disease evaluated both at the beginning of antibiotic therapy and 6 months later showed that IFN γ levels were always lower in the second evaluation. By contrast, no differences were found in levels of the other cytokines.

Conclusions IFN γ production is low in early BU, and increases in late BU and healing, suggesting a role of this cytokine in infection clearance. Moreover, evaluation of IFN γ serum levels may be a useful tool to monitor the immune response during the BU course.

requires long time and evaluation of the real status of the disease may be difficult.

The pathogenesis of BU depends on the toxin produced by *M. ulcerans*, i.e. Mycolactone, which can induce apoptosis of subcutaneous adipocytes and other cell types.^{4,5} Moreover, Mycolactone may also be involved in bacterial elusion of the immune response as it has been shown to inhibit the anti-*M. ulcerans* response.^{2,6} In the last years, several studies investigated the immune response in BU patients. Even if some controversial results have been reported, most of them showed a predominance of a T helper type 2 (TH2) response, with high secretion of interleukin (IL)-10, during the early phases of the disease, followed by a TH type 1 (TH1) response, with high secretion of IFN- γ , in the advanced phases and healed subjects. These studies have been performed either *in vitro* on

1297

peripheral blood mononuclear cells or whole blood cultures stimulated with mycobacterial antigens, or *in vivo* by immunohistochemical evaluation of cytokine expression on skin biopsies.^{7–12} To date, data on direct measurement of serum levels of cytokines in BU patients are lacking. The aim of this study was to investigate serum levels of TH1 and TH2 cytokines in different clinical phases of BU. Furthermore, we evaluated the levels of IL-17, produced by TH17 cells which are a novel proinflammatory subset of TH cells.

Methods

Patients

Recruitment of patients and controls took place during our (G.L. and E.Z.) visit to the "Centre de Dépistage et de Traitement de l'Ulcère de Buruli" (CDTUB) of Allada, Benin. A total of 34 subjects were enrolled. They were divided into the following three groups: (i) 16 patients with active BU (11 males, five females; mean age 13.6 years), (ii) four patients with a previous history of BU (three males, one female; mean age 18.2), but healed after antibiotic therapy, and (iii) 14 subjects were healthy controls (eight males, six females; mean age 12.4 years). All patients met the WHO criteria for *M. ulcerans* disease, and subjects with history of tuberculosis and leprosy were excluded.^{13,14} Furthermore, active bacterial, protozoan and viral diseases were excluded by medical history and physical examination of the enrolled patients. All subjects were HIV negative and lived in the same endemic areas for BU in Couffo and Atlantique departments in Benin. BU diagnosis was

confirmed in all cases by Ziehl–Neelsen stains or PCR (IS2404). Each patient was classified clinically according to the lesion morphology (nodule, plaque, ulcer, and edema) and administration of antibiotic therapy according to the WHO Guidelines (intramuscular streptomycin 15 mg/kg body weight plus oral rifampicin 10 mg/kg body weight, administered daily for 8 weeks)¹⁵ (Table 1). According to therapy, patients with active BU were divided into three groups: untreated patients ($n = 5$), patients who had started therapy <15 days before our analysis ($n = 6$), and patients who had started therapy 15–30 days before our analysis ($n = 5$). According to clinical lesions, they were grouped into those showing pre-ulcerative (i.e. plaque, nodule and/or lymphedema, $n = 7$) or ulcerative lesions ($n = 9$). According to the onset of infection, as reported in the case notes of each patient, they were grouped into those with early (<2 months from onset, $n = 8$) or late (>2 months, $n = 8$) disease.

Three milliliters of venous blood were collected under complete aseptic conditions from each patient or control subjects, and were left to clot for 30 min. After coagulation, the sample was centrifuged for 15 min at 1000 *g* to obtain serum, and stored at –80 °C for the subsequent assay. Informed consent was obtained from all patients and controls or from their parents or caregivers for minors. The study was carried out according to the principles of the Declaration of Helsinki.

Cytokine analysis

Serum levels of IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- α , and IFN- γ were evaluated with the cytofluorimetric Human TH1/TH2 CBA kit (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ,

Patient	Gender	Age	Observed lesion	Site	Disease onset	Diagnosis	Days of therapy
1	F	10	Plaque	Right arm	2 wk	ZN	0
2	M	8	Ulcer	Left thigh	3 wk	ZN	0
3	M	12	Plaque	Left elbow	3 wk	PCR	0
4	M	12	Edema	Left lower limb	1 mo	ZN	0
5	M	14	Ulcer	Back	1 mo	PCR	15
6	M	12	Edema	Left lower limb	2 mo	PCR	15
7	F	40	Ulcer	Right hand	2 mo	PCR	7
8	F	1	Ulcer	Abdomen	2 mo	PCR	3
9	M	15	Nodule	Right knee	3 mo	PCR	7
10	M	9	Ulcer	Left thigh	3 mo	PCR	30
11*	F	9	Plaque	Left knee	3 mo	PCR	7
12*	M	6	Plaque	Thorax	6 mo	ZN	14
13*	M	15	Ulcer	Left arm	7 mo	PCR	9
14*	F	19	Ulcer	Abdomen	1 yr	PCR	0
15	M	18	Ulcer	Left foot	2 yr	ZN	21
16	M	19	Ulcer	Left arm	5 yr	ZN	30

Table 1 Characteristics of the patients with Buruli ulcer in the study

The median line in the Table separates "early" BU and "late" BU. The asterisks mark the patients who underwent to a follow-up withdrawal for the second evaluation of cytokine levels.

wk, week; mo, month; yr, year; ZN, Ziehl–Neelsen; PCR, polymerase chain reaction.

USA), while concentration of IL-17 was evaluated using Quantikine Human IL-17 Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. All values represent the medians and are expressed in pg/ml.

Statistical analysis

Results were analyzed using GraphPad Prism 4 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Cytokine values were compared with the Kruskal–Wallis test, followed by the Mann–Whitney *U*-test. The Spearman correlation test was used to compare distribution of interferon (IFN) γ and IL-10 values in BU patients. Longitudinal data were compared with the Wilcoxon matched pairs test. Significance was set at $P < 0.05$.

Results

Interleukin-17, IL-4, and IL-5 levels were always under the detection limits of the assays in both patients and controls, whereas IL-2, IL-10, IFN γ , and TNF α were detectable (Table 2). Comparison of levels in patients with active BU, healed patients, and controls showed that IFN- γ levels were higher in healed patients than in controls ($P = 0.015$), whereas patients with active BU displayed levels not different from controls. A similar trend was displayed by IL-2 and TNF α , but differences were

not significant. By contrast, IL-10 levels were similar in all groups (Fig. 1).

These data show that IFN γ and, possibly, other TH1 type cytokines (i.e. IL-2, TNF α) are produced at low levels in the phase of active disease, and are up-modulated upon healing, which suggests they play a role in clearing of infection. Therefore, we analyzed the kinetic of this response by comparing cytokine levels in patients with “early” vs. “late” active BU. Results showed that patients with late infection displayed higher IFN γ levels than those with early infection ($P = 0.01$). Moreover, early infection levels were significantly lower than those of healed subjects ($P = 0.008$), whereas late infection levels were significantly higher than those of healthy subjects ($P = 0.036$). A similar trend was displayed in the levels IL-2 and TNF α , but differences were not significant. No difference was found in IL-10 levels (Fig. 1), which did not display any correlation with the level of other cytokines, as detected by the Spearman test (data not shown).

Analysis of patients according to clinical lesions showed that level of IFN- γ was higher in ulcerative than in pre-ulcerative phases ($P = 0.023$), while any significant difference was found in other TH1 cytokine levels (Fig. 1).

Analysis of patients according to therapy did not detect any significant difference of cytokine levels in the different patient groups (untreated, treated for >15 days, and treated for 15–30 days; data not shown).

Finally, four patients (all with “late” BU) were evaluated both at the beginning of antibiotic therapy (<2 weeks from starting of therapy) and 6 months later, when three had reached complete recovery, and one showed marked clinical improvement of the lesions. Results showed that IFN γ levels were always lower in the second evaluation (Fig. 2).

Table 2 Concentrations of cytokines in the samples

IFN- γ			
BU	4.60	Early BU: 2.9 Late BU: 5.8	Pre-ulcerative: 3.40 Ulcerative: 5.00
Healed	15.25	Late Healed ^a 4.05	
Controls	1.45		
IL-2			
BU	2.85	Early BU: 2.85 Late BU: 2.90	Pre-ulcerative: 2.90 Ulcerative: 2.80
Healed	4.15	Late Healed ^a 2.65	
Controls	2.65		
TNF- α			
BU	1.80	Early BU: 1.75 Late BU: 1.80	Pre-ulcerative: 1.90 Ulcerative: 1.70
Healed	5.55	Late Healed ^a 1.85	
Controls	2.20		
IL-10			
BU	7.00	Early BU: 7.00 Late BU: 5.95	Pre-ulcerative: 5.50 Ulcerative: 12.10
Healed	8.20	Late Healed ^a 8.85	
Controls	8.60		

^aData obtained in four patients, 6 months after antibiotic therapy.

Concentrations of detectable cytokines (IFN γ , IL-2, TNF α , and IL-10) in sera of patients. All values represent the median and are expressed in pg/ml.

Discussion

Mycobacterium ulcerans infection is a severe cutaneous and subcutaneous disease mainly affecting sub-Saharan Africa, where it represents a severe health problem. Therefore in 1998, WHO developed the Global Buruli Ulcer Initiative, and thereafter the interest had increased on this disease from both a clinical and research perspective.¹⁶

With some contradictions, studies assessing the *in vitro* lymphocyte response to bacterial antigens or cytokine levels in the skin lesions suggested that the infection is characterized by downregulation of the TH1 response and predominance of the TH2 response in the early phases, followed by increase of the TH1 response eventually bringing to healing.^{2,7–12} It has been suggested that TH1 cytokines might protect exposed subjects from developing

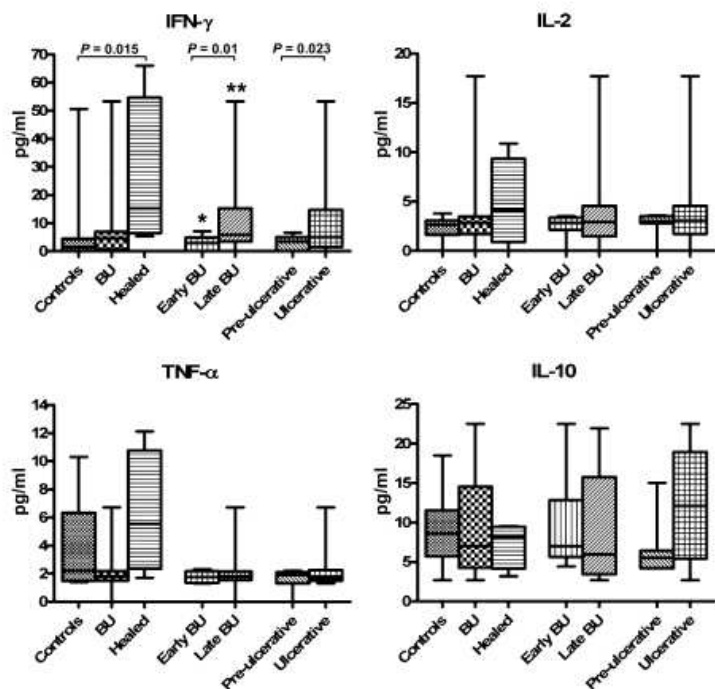


Figure 1 Serum cytokine levels in Buruli ulcer (BU) patients and controls. Comparison of patients affected with active BU (early BU, late BU, pre-ulcerative, and ulcerative), healed patients, and controls. *Early BU vs. healed patients ($P = 0.008$); **Late BU vs. controls ($P = 0.036$). Boxes show the medians and interquartile ranges (25th and 75th percentiles), bars show the whole ranges. Note that scales are different for each cytokine.

the disease and that mounting of a TH1 response might mark initial recovery in affected subjects.^{8,12} Therefore, these data suggest that the TH1 response is crucial to clear the infection, which is in line with the general model of the immune response to mycobacteria.¹⁷⁻¹⁹ However, *in vitro* studies and analysis of the skin lesions are relatively difficult and time consuming, and they can be

affected by several confounding and technical factors. Therefore, we performed this work to monitor the TH response by measuring the serum cytokine levels. Our analysis involved a relatively small number of subjects, but seems to confirm the model that the TH1 response, and particularly IFN γ production, is important to clear the infection. IFN γ levels, indeed, were low in early and pre-ulcerative phases of the disease, but they increased in late and ulcerative phases, and in healed subjects. By contrast, levels of TH2-type cytokines and IL-10 did not correlate with the disease status. Moreover, the immune response seemed not to involve IL-17, secreted by pro-inflammatory TH17 cells, whose levels were undetectable in all subjects.

The data suggest that increased IFN γ levels may mark not only mounting of an effective immune response that may favor tissue damage and ulcer development, but also infection clearance and healing. This view is supported by analysis of the four patients evaluated both at the beginning of antibiotic therapy and 6 months later (when three had reached complete recovery, and one showed marked clinical improvement of the lesions) as IFN γ levels were always highest in the first evaluation. This model is in line with data reported by other authors. Gooding *et al.*⁹ showed that the IFN γ response *in vitro* is downregulated after healing following surgical treatment. Yeboah-Manu *et al.*²⁰ showed that the IFN γ response *in vitro* returns to

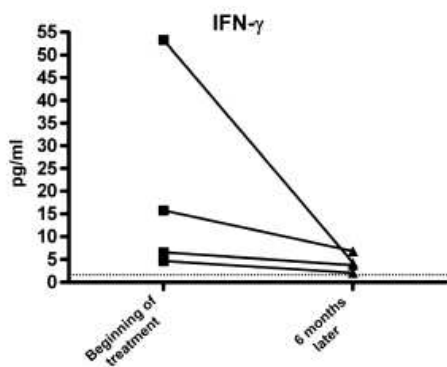


Figure 2 Interferon (IFN γ) levels in four patients at the beginning of antibiotic therapy and 6 months later. In all patients, the IFN γ levels decreased after treatment. The horizontal dotted line represents the median of IFN γ levels in controls

normal levels up to 10 months after BU infection. Sarfo *et al.*²¹ showed that IFN γ secretion *in vitro* peaks after 8 weeks of antibiotic therapy, especially in the large ulcerative forms. Phillips *et al.* have performed a comprehensive study on chemokines and cytokines production in serum samples and in mycolactone-stimulated whole-blood culture supernatants of BU patients from Ghana. Interestingly, they found that patients with active disease displayed a distinctive profile of reversible immune suppression that was induced early in the disease and resolved after antibiotic therapy. Worthy of note, they showed that seric inflammatory cytokines were not modulated during the course of antibiotic therapy, except for IL-4 which displayed a significant higher serum level 10 months after completion of the antibiotic therapy.²² In our study, IL-4 levels were under the detection limits in all samples, confirming that such cytokine is down-regulated during active disease and the first 6 months after therapy.

Recent findings have reported that presence of granulomas correlates with high IFN γ production *in vitro*,^{23,24} furthermore, our study did not evaluate the correlation between cytokine levels and histological features of lesions (presence of granulomas and intra- or extra-cellular *Mycobacteria*), as an accurate analysis of lesions would require to extend the analysis to the whole lesion.^{24,25}

In conclusion, our data suggest that IFN γ production is low in early BU, and increases during its evolution and healing, supporting the model that the TH1 response is crucial to clear the infection. Moreover, even if the present study has been performed with a mere experimental and speculative aim, our data suggest that evaluation of IFN γ serum levels may represent, in the near future, a useful tool to monitor the immune response and the clinical course of the disease, mainly in selected clinical cases.

Our study suffers from a few limitations: first, the number of patients should be increased to obtain more significant results and more homogeneous groups as concerning various factors (onset of the disease, clinical lesions, and antibiotic administration) have to be chosen. Secondly, it would be interesting to establish a correlation between levels of serum cytokines and their productions in stimulated blood cultures and/or histological specimens collected from the same patients.

In conclusion, further studies are needed to confirm these preliminary results, and a large sample size is required.

Acknowledgments

The authors wish to thank the enrolled subjects and the medical and nursing staff of the "Centre de Depistage et

de Traitement de l'Ulcère de Buruli" (CDTUB) at the "Le Luxembourg" Hospital, Allada, Benin. They also thank the Rotary Clubs of Milano Aquileia, Bergamo, Novara (Italy) and New York and the Franciscan Friars of Immacolata in Benin, for their friendly hospitality during their stay in Allada. This study was supported by research funding from Regione Piemonte (Ricerca Sanitaria Finalizzata Project and Ricerca Sanitaria Applicata-CIPE Project).

References

- van der Werf TS, Stienstra Y, Johnson RC, *et al.* *Mycobacterium ulcerans* disease. *Bull World Health Organ* 2005; 83: 785-791.
- Wansbrough-Jones M, Phillips R. Buruli ulcer: emerging from obscurity. *Lancet* 2006; 367: 1849-1858.
- Senior K. Buruli ulcer: dare we continue to ignore it? *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 273.
- George KM, Pascopella L, Welty DM, *et al.* A *Mycobacterium ulcerans* toxin, mycolactone, causes apoptosis in guinea pig ulcers and tissue culture cells. *Infect Immun* 2000; 68: 877-883.
- Dobos KM, Small PL, Deslauriers M, *et al.* *Mycobacterium ulcerans* cytotoxicity in an adipose cell model. *Infect Immun* 2001; 69: 7182-7186.
- WHO. Report of the 2008 Technical Advisory Group (TAG) Meeting on Buruli ulcer. Available at: http://www.who.int/buruli/events/TAG_report_FINAL.pdf.
- Gooding TM, Johnson PD, Campbell DE, *et al.* Immune response to infection with *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun* 2001; 69: 1704-1707.
- Gooding TM, Johnson PD, Smith M, *et al.* Cytokine profiles of patients infected with *Mycobacterium ulcerans* and unaffected household contacts. *Infect Immun* 2002; 70: 5562-5567.
- Gooding TM, Kemp AS, Robins-Browne RM, *et al.* Acquired T-helper 1 lymphocyte anergy following infection with *Mycobacterium ulcerans*. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1076-1077.
- Prevot G, Bourreau E, Pascalis H, *et al.* Differential production of systemic and intralésional gamma interferon and interleukin-10 in nodular and ulcerative forms of Buruli disease. *Infect Immun* 2004; 72: 958-965.
- Westenbrink BD, Stienstra Y, Huitema MG, *et al.* Cytokine responses to stimulation of whole blood from patients with Buruli ulcer disease in Ghana. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 125-129.
- Phillips R, Horsfield C, Kuijper S, *et al.* Cytokine response to antigen stimulation of whole blood from patients with *Mycobacterium ulcerans* disease compared to that from patients with tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 253-257.
- Asiedu KSR, Raviglione M. *Buruli Ulcer: Mycobacterium Ulcerans* Infection. World Health Organization 2000.

- Available at: http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_CDS_CPE_GBUI_2000.1.pdf.
- 14 WHO. *Report of the 2007 Technical Advisory Group (TAG) Meeting on Buruli Ulcer*. Available at: http://www.who.int/buruli/events/Report_2007_meeting_FINAL.pdf.
 - 15 World Health Organization. *Global Buruli Ulcer Initiative: provisional guidance on the role of specific antibiotics in the management of Mycobacterium ulcerans disease (Buruli Ulcer) 2004*. Available at: <http://www.who.int/buruli/information/antibiotics>.
 - 16 WHO. *Global Buruli Ulcer Initiative*. Available at: <http://www.who.int/buruli/gbui/en/index.html>.
 - 17 Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, et al. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 1993; 178: 2249–2254.
 - 18 Lienhardt C, Azzurri A, Amedei A, et al. Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity *in vivo*. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1605–1613.
 - 19 Jo EK, Park JK, Dockrell HM. Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 205–210.
 - 20 Yeboah-Manu D, Peduzzi E, Mensah-Quainoo E, et al. Systemic suppression of interferon-gamma responses in Buruli ulcer patients resolves after surgical excision of the lesions caused by the extracellular pathogen *Mycobacterium ulcerans*. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 1150–1156.
 - 21 Sarfo FS, Phillips RO, Ampadu E, et al. Dynamics of the cytokine response to *Mycobacterium ulcerans* during antibiotic treatment for *M. ulcerans* disease (Buruli ulcer) in humans. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16: 61–65.
 - 22 Phillips R, Sarfo FS, Guenin-Macé L, et al. Immunosuppressive signature of cutaneous *Mycobacterium ulcerans* infection in the peripheral blood of patients with Buruli ulcer disease. *J Infect Dis* 2009; 200: 1675–1684.
 - 23 Kiszewski AE, Becerril E, Aguilar LD, et al. The local immune response in ulcerative lesions of Buruli disease. *Clin Exp Immunol* 2006; 143: 445–451.
 - 24 Schipper HS, Rutgers B, Huitema MG, et al. Systemic and local interferon-gamma production following *Mycobacterium ulcerans* infection. *Clin Exp Immunol* 2007; 150: 451–459.
 - 25 Peduzzi E, Groeper C, Schutte D, et al. Local activation of the innate immune system in Buruli ulcer lesions. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 638–645.

THE -346T POLYMORPHISM OF THE SH2D1A GENE IS A RISK FACTOR FOR DEVELOPMENT OF AUTOIMMUNITY/LYMPHOPROLIFERATION IN MALES WITH DEFECTIVE FAS FUNCTION

Elena Boggio ^a, Matteo Melensi ^a, Sara Bocca ^a, Annalisa Chiocchetti ^a, Cristoforo Comi ^{b,c}, Nausicaa Clemente ^a, Elisabetta Orilieri ^a, Maria Felicia Soluri ^a, Sandra D'Alfonso ^a, Rosella Mechelli ^d, Giovanna Gentile ^e, Alessandro Poggi ^f, Marco Salvetti ^d, Ugo Ramenghi ^g, Umberto Dianzani ^{a,*}

^a*Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD) and Department of Health Sciences, "A. Avogadro" University of Eastern Piedmont, Novara, Italy*

^b*Department of Translational Medicine, "A. Avogadro" University of Eastern Piedmont, Novara, Italy*

^c*Neurorehabilitation Center, M.L. Novarese, Moncrivello, Vercelli, Italy*

^d*Department of Neurology and Center for Experimental Neurological Therapy, S. Andrea Hospital, University of Roma La Sapienza, Roma, Italy*

^e*Department of Biochemical Sciences-DIMA Centro Diagnostica Molecolare Avanzata, S. Andrea Hospital, University of Roma La Sapienza, Roma, Italy*

^f*Laboratory of Molecular Oncology and Angiogenesis, National Institute for Cancer Research, Genova, Italy*

^g*Department of Pediatrics, University of Torino, Torino, Italy.*

***Corresponding author.**

Umberto Dianzani, IRCAD-Department of Health Sciences, Via Solaroli, 17, I-28100, Novara, Italy. e-mail: dianzani@med.unipmn.it Tel:+390321660668 – Fax +390321620421.

Abbreviated title: Role of SAP in autoimmunity/lymphoproliferation

Disclosure of potential conflict of interest: The authors declare that there are no conflicts of interest

Abbreviations:

ALPS (Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome)

DALD (Danzani Autoimmune Lymphoproliferative Disease)

CTL (Cytotoxic T Lymphocytes)

TCR (T-cell Receptor)

DN T (Double-Negative T cells)

OPN (Osteopontin)

PRF1 (Perforin)

AICD (Activation Induced Cell Death)

SAP (Slam Associating Protein)

SLAM (Signaling Lymphocyte Activation Molecule)

NK (Natural Killer cells)

NKT (Natural Killer T cells)

XLP (X-linked Lymphoproliferative)

EBV (Epstein Barr Virus)

SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

IFN- γ (Interferon- γ)

MS (Multiple Sclerosis)

PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell)

FBS (Fetal Bovine Serum)

PHA (Phytohemagglutinin)

mAb (monoclonal antibody)

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

IL (Interleukin)

LD (Linkage Disequilibrium)

TDT (Transmission Disequilibrium Test)

Abstract

Inherited defects decreasing function of the Fas death receptor cause Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) and its variant Diansani Autoimmune Lymphoproliferative Disease (DALD). Since a deleterious mutation of the *SH2D1A* gene protects MRL lpr/lpr mice from ALPS development, we investigated the role of *SH2D1A*, located in the X chromosome, in 51 patients with ALPS or DALD by mutational screening of coding and regulative sequences.

Allelic frequency of the -346C>T polymorphism was different in male patients and controls (-346T: 61% versus 36%, $p=0.01$), with similar frequencies in ALPS and DALD. By contrast, no differences were found among females or between the controls and patients with multiple sclerosis (229 males, 157 females). Further analyses showed that -346C was a methylation site in CD8⁺ T and Natural Killer cells, and *SH2D1A* expression was higher in -346T than in -346C males. Finally, in vitro activated T cells from -346T males produced lower amounts of interferon- γ than those from -346C males.

These data suggest that -346T is a predisposing factor for ALPS and DALD in males possibly because of its effect on SAP expression influencing the T cell response.

Keywords: SAP, Autoimmune Lymphoproliferation, XLP, Fas

1. Introduction

Fas/Apo-1 (CD95) is a ubiquitous death receptor and cells expressing it undergo apoptosis upon interaction with Fas ligand (FasL) [1-3]. In lymphocytes, Fas triggering does not induce apoptosis in resting and recently activated T cells, but the apoptosis-inducing pathway is connected to Fas several days after cell activation. This Fas/FasL interaction is involved in shutting-off immune responses, lymphocyte lifespan regulation, and maintenance of peripheral tolerance. Moreover, Cytotoxic T Lymphocytes (CTL), T helper 1 (T_{H1}), and Natural Killer (NK) cells express FasL, whose interaction with Fas expressed by target cells is one of the mechanisms they use to exert their cytotoxic function.

The autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) is characterized by defective function of Fas, autoimmune manifestations that predominantly involve blood cells (i.e. thrombocytopenia, anemia, neutropenia), polyclonal accumulation of lymphocytes in the spleen and lymph nodes, and peripheral expansion of T cell receptor (TCR) $\alpha\beta^+$ CD4/CD8 double-negative (DN) T cells [4-9]. Moreover, ALPS patients are predisposed to develop lymphomas in adulthood [10].

Most ALPS cases are due to deleterious mutations of the Fas gene (ALPS-FAS), though a few patients carry mutations of the FasL gene (ALPS-FASL) or the caspase 10 gene (ALPS-CASP10). However, the mutated gene is not known in a substantial proportion of patients (ALPS-U) [4-9]. In mice, a disease overlapping ALPS is displayed by *MRL^{lpr/lpr}* and *gld/gld* mice, carrying mutations of the Fas and the FasL gene respectively [1,2,11]. Moreover, we described an incomplete form of ALPS fulfilling the first three criteria, but lacking an expansion of DN T cells. These patients did not display Fas, FasL, or caspase 10 mutations, although most of their parents displayed the Fas function defect and we suggested an involvement of inherited mutations hitting the Fas pathway downstream from the receptor [9,12-14]. Since the complete paradigm of ALPS could not be demonstrated, this form has been named Dianzani Autoimmune Lymphoproliferative Disease (DALD) by McKusick (OMIM Database ID: 601240, reference %605233) [9].

In addition to the causal mutations, the genetic background may influence ALPS development. This may explain the incomplete penetrance of mild mutations. In mice, the *lpr* and *gld* mutations cause the disease in homozygosity, but they cause a much milder clinical picture in strains other than the MRL one [11]. Although most ALPS-FAS patients are heterozygous for the Fas mutation, the parent carrying the mutation is generally healthy. The same observation is true in DALD patients, since both parents generally display defective Fas function, but are healthy [12-14]. Other complementary factors may thus be required in function of the severity of the mutation [15]. In previous works, we suggested that concurrent factors may be variants of the osteopontin (*OPN*) and perforin (*PRF1*) genes that were associated with both ALPS and DALD [16-18]. These variants seem to influence the expression/function of the products of these genes and may inhibit immune response switching off mechanisms alternative to the Fas one. In particular, the *OPN* gene variants increase expression of this cytokine that inhibits activation-induced cell death (AICD) of lymphocytes, whereas the *PRF1* gene variants decrease function of this protein that is involved in fratricide of activated immune cells by activated cytotoxic lymphocytes.

Signaling lymphocyte activation molecule (SLAM)-associated protein (SAP) is an intracellular adaptor protein that consists of a single Src homology 2 (SH2) domain and is expressed by T cells, NK cells, NK T (NKT) cells, eosinophils, platelets, and some B cell populations [19]. SAP regulates the function of many receptors belonging to the SLAM family by binding to their cytoplasmic tails and serving as a docking platform for signaling molecules. Receptors of the SLAM family have been implicated in the regulation of NK cell cytotoxicity, NKT cell development, T_{H2} cell priming, isotype switching, and maintenance of long-term antibody-secreting cells. The SAP gene (*SH2D1A*) is located in the X chromosome (Xq25-q26) and consists of 4 exons and 3 introns spanning approximately 25 kilobase (kb) [20]. Deleterious mutations of *SH2D1A* cause X-linked lymphoproliferative disease (XLP), characterized by inability to mount an effective immune response to Epstein-Barr virus (EBV) with fulminant infectious

mononucleosis, polyclonal lymphoproliferation and/or B cell lymphomas, and dysgammaglobulinaemia that can progress to hypogammaglobulinaemia [20-22]. A rarer manifestation is the development of autoimmune disorders such as vasculitis, colitis and psoriasis. The phenotype of SAP-deficient mice recapitulates several features of XLP [23].

This work analyzed *SH2D1A* in ALPS and DALD patients and was prompted by the observation of Komori H et al. [24] that, in a breeding colony of MRL lpr/lpr mice, a spontaneous mutation of *SH2D1A* causing the loss of SAP expression resulted in partial protection from the *lpr* disease, that suggested an opposite epistatic relationship between the Fas and SAP defects. We found that ALPS and DALD patients displayed an increased frequency of the -346T single nucleotide polymorphism (SNP) in *SH2D1A* causing a loss of the -346C methylation site and correlating with increased SAP expression and decreased interferon (IFN)- γ production. These data suggest that high SAP expression favors development of ALPS and DALD in humans and confirm the data reported on MRL lpr/lpr mice.

2. Subjects and Methods

2.1. Patients

We analyzed 27 patients with inherited forms of ALPS (15 males, 12 females) and 24 patients with DALD (16 males, 8 females) observed in the Paediatric Department, University of Turin. Diagnosis of ALPS and DALD were done according to the criteria indicated in the 2009 ALPS NIH International Workshop [9]. All patients were unrelated. Mothers and fathers of a random subset of unrelated patients were also available for genotyping. Moreover, we analyzed 386 patients (229 males, 157 females) with Multiple Sclerosis (MS) from the MS Center of the "Amedeo Avogadro" University of Eastern Piedmont (Novara). The study was planned according to the guidelines of the local ethical committee. A total of 534 matched healthy individuals were used as control subjects. All patients, controls, and their parents were Italian.

2.2. Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated by Ficoll-Hypaque (Lympholyte-H, Cedarlane Laboratories, Netherlands) density-gradient centrifugation. To examine SAP expression and evaluate the -346C methylation, PBMC were stimulated with 1 µg/ml phytohemagglutinin (PHA, Sigma, St Louis, MO) at day 0 and cultured for 3 or 5 days in RPMI 1640 medium (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen), L-glutamine, and penicillin-streptomycin (Invitrogen) and IL-2 (10 U/mL) (Sigma). At the end of the culture, CD4⁺ (T_H), CD8⁺ (CTL) and CD16⁺ (NK) cells were positively purified using magnetic microbeads (Miltenyi Biotec, GmbH, Germany) and analyzed for SAP expression. In some experiments, CTL and NK cells were negatively purified from fresh PBMC using the RosetteSep® Human CD8⁺ T Cell Enrichment Cocktail and the RosetteSep® Human NK Cell Enrichment Cocktail (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) and then cultured as reported above.

2.3. DNA amplification and sequence analysis

Genomic DNA was isolated from PBMC using standard methods, and 954 bp of the 5' UTR region, exons 1 to 4 and intron/exon boundaries, and the 3'UTR of *SH2D1A* were amplified in standard PCR conditions. Samples were sequenced on an Applied Biosystem 3100 Genetic Analyzer using the Big Dye terminator cycle-sequencing reaction kit (Applied Biosystem, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. In particular, the 5'UTR was amplified using the primers forward 5'-AACAGATTTTATGGACAAAAT-3' and reverse 5'-ACAGGGGAGGAACATTGGAA-3', and sequenced using the primer 5'-CTCAGGATCAAGACTTCTCA-3'.

2.4. Methylation analysis

DNA samples were modified by treatment with sodium bisulphite using a bisulphite CT conversion kit (EZ DNA Methylation-Gold kit-Zymo Research, Irvine, CA). Briefly, DNA (300 ng) was treated with bisulphite DNA conversion reagent according to the manufacturer's protocol. Bisulphite conversion was carried out in a thermal cycler at 98°C for 10 min, 64°C for 2.5 hours, and moved to 4°C for 1 hour. The bisulphite-treated DNA was purified by Zymo-Spin IC Column and eluted in 10 µl of M-Elution Buffer. Samples were conserved at -20°C. The region covering the SNP of interest was amplified by PCR using specific primers, one of which was biotinylated. Hot-start PCR was performed with Premix Ex Taq (Takara) with an annealing temperature of 55°C. 3 µl of bisulphite-converted DNA was used as a template. The amplicon was sequenced using the Pyrosequencer PyroMark ID system (Biotage AB and Biosystems, Uppsala, Sweden). Single stranded DNA was isolated from PCR reaction using the Pyrosequencing Vacuum Prep Workstation (Biotage AB) and Streptavidin Sepharose TM High Performance beads (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL) that bind the biotinylated primer. A specific primer was used

for Real Time sequencing. The target CpG was evaluated by converting the resulting pyrograms to numerical values for peak heights.

2.5. Real-Time RT-PCR

Total RNA was isolated from PBMC cultures, using TRIzol reagent (Invitrogen). RNA (500 ng) was retrotranscribed by the ThermoScript™ RT PCR System (Invitrogen). SAP expression was evaluated with a gene expression assay (Assay-on Demand: SAP, Assay No. Hs00158978_m1; Applied Biosystem). The Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH Assay No. Hs99999905_m1) was used to normalize for cDNA amounts. Real Time PCR was performed using the 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem) in duplicate for each sample in a 20 µL final volume containing 1 µL diluted cDNA, 10 µL TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystem), and 1 µL Assay-on Demand mix. The thermocycler parameters were 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The results were analyzed with a Delta-Delta CT method.

2.6. Western blot analysis

Cells were washed twice with PBS and lysed for 20 min on ice in a lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl-pH 8, 0.5% Nonidet P40 Substitute, 5mM EDTA, aprotinin 1 µg/ml, leupeptin 1 µg/ml, pepstatin A 1 µg/ml, PMSF 100 µg/ml). Lysates were then cleared by centrifugation for 20 min at 13000 rpm at 4°C and separated on 12% SDS-PAGE gel after denaturation in SDS-PAGE loading buffer (63 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% Glycerol, 1% SDS, 2.5% bromophenol-blue), and transferred to nitrocellulose. Filters were then blocked in TBST buffer plus 5% non-fat milk for 1 hour and then incubated with anti-SAP monoclonal antibody (mAb) (Upstate, Lake Placid, NY) overnight at 4°C in TBST buffer plus 5% Bovine Serum Albumin. SAP signals were revealed with a peroxidase-conjugated anti-mouse Ig secondary antibody (GE, Healthcare) and detected by

enhanced chemiluminescence. Beta-actin was detected with mouse mAb (Sigma) and detected with the same secondary antibody. Bands were quantified with the GelDoc EQ system (BioRad, Hercules, CA).

2.7. Functional assays

PBMC were cultured for 9 days in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, PHA (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and IL-2 (2 U/ml) to increase SLAM expression. Then, cells ($1 \times 10^5/\text{well}$) were seeded in round-bottom 96-well plates pre-coated with 100 μl of anti-CD3 mAb (OKT3, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) overnight at 4°C, and cultured for 72 hours in the presence and absence of soluble anti-SLAM mAb (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; BioLegend, San Diego, CA). Secretion of cytokines was evaluated in the supernatants after 72 hours of culture by capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Interleukin (IL)-4 and IFN- γ using ELISA MAXTM Deluxe (BioLegend), IL-10 and IL-17 using Human DuoSet (R&D System, Minneapolis, MN). To analyze cell proliferation, [³H] thymidine (0.5 $\mu\text{Ci}/\text{well}$) was added during the last 6 h of culture; cells were then harvested and [³H] thymidine uptake was evaluated with a β -counter (Perkin Elmer).

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses of allele and genotype distributions were performed using the χ^2 test with Yates's correction. Haplotype analysis was performed using the Haploview program (3.11 version, Broad Institute of MIT and Harvard, 2003-2006). This program also calculated pairwise linkage disequilibrium (LD) values (r^2 and Lewontin D') among the SNP alleles. Allele transmission from the mothers to the affected sons was evaluated according to the Affected Family-Based Control (AFBAC) method. In families ascertained for the presence of an affected child, the parental alleles not transmitted to the affected child were used as "control" alleles whereas the parental transmitted alleles were used as "case" alleles. Transmission Disequilibrium

Test (TDT) analysis was performed using Haploview program. The use of nuclear-family data in case-control association studies was developed to avoid possible ethnic mismatching between patients and randomly ascertained controls. Functional data were analyzed with the non-parametric Mann-Whitney U test.

3. Results

To assess the role of *SH2D1A* in development of ALPS and DALD, the genomic DNA corresponding to the 5'UTR, the four exons and their intron/exon boundaries, and the 3'UTR of *SH2D1A* were sequenced in 31 male patients with ALPS or DALD (6 ALPS-FAS, 9 ALPS-U, and 16 DALD), and 369 male healthy controls, since variations of a X-linked gene would have a prominent effect in males. In both patients and controls, we only found three SNPs, i.e. -346C>T (rs12164382) in the 5'UTR, and -494G>A (rs7357894) and -631G>A (rs990545) in the 5' flanking region (numeration is referred to ATG=+1). Results showed that the frequencies of the -346T and -631A alleles were significantly higher in the patients than in the controls (-346T: 61% vs 36%; -631A: 61% vs 37%) and conferred an OR of 2.78 (CI 95%: 1.24-6.30; p=0.01) and 2.74 (1.22-6.22; p=0.01), respectively, for ALPS or DALD development (Table 1). No significant difference was found in the frequency of -494G>A.

To assess whether a similar association was detectable in females too, we typed the three SNPs in 20 female patients with ALPS or DALD (3 ALPS-FAS, 9 ALPS-U, 8 DALD) and 165 matched controls. Results showed that allelic and genotypic frequencies were similar in patients and controls among the females. Moreover, allelic frequency of -346T and -631A were significantly higher in the males than in the females among the patients (-346T: 61% vs 31%, p=0.029; -631A: 61% vs 34%, p=0.049). No significant difference was found in the frequency of the -494G>A alleles (Table 2).

Highly significant pairwise LD was observed between the three SNPs and, in particular, -346C>T was in almost perfect LD with -631G>A (D' 0.96, r^2 0.8) (Table 3).

The Transcription Element Search System analysis program (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess>) showed that the three SNPs did not modify the putative binding sites of transcription factors, but -346C was reported as a putative methylation site [25], suggesting that -346C>T may influence the gene expression. Therefore, we focused our further analyses on -346C>T.

Dissection of data according to the ALPS or DALD diagnosis showed that frequency of -346T was almost identical in ALPS and DALD patients in both males (ALPS: 60%, N=15; DALD: 62%, N=16) and females (ALPS: 33%, N=12; DALD: 31%, N=8). Clinical analysis did not detect any substantial difference between -346T and -346C patients in term of the lymphoproliferative picture and autoimmune manifestations (data not shown).

Typing of the -346C>T alleles in the available fathers (N=21) and mothers (N=22) of the male patients showed that, among the non transmitted alleles (paternal alleles and non transmitted maternal alleles), frequencies (-346C: 60%; -346T: 40%) were similar to those detected in the healthy control groups, which showed that the general population used as a control was ethnically matched with the patients' families. Intriguingly, analysis of the heterozygous mothers by the TDT analysis showed a preferential transmission of -346T (transmitted:non-transmitted alleles= 9:4), but results did not reach statistical significance because of the small number of subjects.

To assess whether -346T has a predisposing effect on autoimmune diseases different from ALPS and DALD, we typed this SNP in 386 patients with MS (229 males and 157 females). Results showed that allelic frequency of -346T was similar in MS patients (38% in both males and females) and the controls, with no gender differences (data not shown).

To investigate whether the -346C>T alleles influence SAP expression, we analysed the SAP mRNA level by Real Time PCR in PBMC after 3 days of culture in the presence of PHA and IL-2, since preliminary experiments showed that SAP was minimally expressed in fresh cells, but it was substantially upregulated in these culture conditions. This analysis was performed in PBMC from males carrying -346C (healthy controls N=10; patients N=5) or -346T (healthy controls N=10; patients N=4). Results showed that -346T carriers, either controls or patients, displayed higher levels of SAP mRNA than the respective -346C carriers ($p=0.001$ and $p=0.01$, respectively) (Fig. 1). In some experiments, the cultured PBMC from the healthy controls (-346C: N=6; -346T: N=6) were used to positively purify the $CD4^+$ (T_H), $CD8^+$ (CTL) and $CD16^+$ (NK) cell

subsets using magnetic microbeads. Results showed that -346T carriers displayed significantly higher levels of SAP mRNA than -346C carriers, in CTL ($p=0.009$) and NK ($p=0.002$) cells; by contrast, the difference was not significant in T_H cells (Fig. 2, left panel). To rule out the possibility that these results were influenced by the positive purification technique, CTL and NK cells (-346C: $N=5$; -346T: $N=5$) were negatively purified from fresh PBMC using the RosetteSep® technique and then cultured as reported above. Analysis of SAP expression confirmed that -346T carriers displayed higher levels of SAP mRNA than -346C carriers in both cell types (CTL $p=0.03$; NK $p=0.04$) (Figure 2, right panel). Moreover, the -346C samples were used to evaluate the methylation state of this site by methylation-specific PCR. Results showed that -346C was methylated and its methylation level was higher in PBMC than in CTL and NK cells (Figure 3). Methylation analysis of PBMC derived from -346C male patients ($N=5$) confirmed methylation of this site (range 17-29 %).

To assess whether the differential expression of SAP was detectable at the protein level too, we analysed SAP expression by western blot in PBMC from healthy males carrying -346C ($N=10$) or -346T ($N=10$), after 5 days of culture in the presence of PHA and IL-2. Results showed that -346T carriers displayed significantly higher levels of SAP than -346C carriers ($p=0.02$) (Figure 4).

To assess whether the -346C>T variants influenced T cell activation, we analysed proliferation and cytokine secretion in T cells from healthy males carrying -346C ($N=8$) or -346T ($N=8$). PBMC were cultured for 9 days with PHA and IL-2 to increase SLAM expression. Then, they were activated with anti-CD3 mAb in the presence and absence of anti-SLAM mAb, and secretion of IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-17, and cell proliferation were evaluated after 3 days. Results showed that -346T carriers produced significantly less IFN- γ than -346C carriers without substantial differences in the presence and absence of SLAM stimulation (Figure 5, left panel). By contrast, no substantial differences were found in secretion of IL-4, IL-10 and IL-17 (data not shown), and cell proliferation (Figure 5, right panel) between -346C and -346T carriers. These

experiments also showed that SLAM stimulation similarly increased cell proliferation in -346C and -346T carriers, but it did not modulate cytokine secretion.

4. Discussion

This work shows that the -346C>T variation of *SH2D1A* is associated with ALPS and DALD and hits a methylation site involved in SAP expression. In particular, patients with ALPS and DALD showed an increased frequency of the -346T allele which lacked the -346C methylation site and was associated with increased expression of SAP in NK and CD8⁺ T cells and decreased secretion of IFN- γ . These data support the possibility of an opposite epistatic relationship between Fas and SAP expression, that has been previously suggested in *MRL^{lpr/lpr}* mice where a spontaneous A insertion at the 21st codon of *SH2D1A* (first exon) causing a frame-shift had resulted in defective expression of SAP and a striking reduction of hypergammaglobulinemia, autoantibody production, DN T cells counts, lymphadenopathy, splenomegaly, and pathological indexes for glomerulonephritis and vasculitis [24].

In our patients and controls, we detected three SNP that were in strong LD and, in particular, -346C>T and -631G>A, which were significantly associated with ALPS/DALD, were in almost perfect LD, whereas their LD with -494G>A was weaker. The -346C>T SNP was the only one with a likely functional effect. The three SNPs were not included in transcription factor binding sites, but -346C had previously been shown to be a putative methylation site [25], and our work experimentally confirmed this possibility and showed that -346T hemizygotes expressed higher levels of SAP than -346C hemizygotes in NK and CD8⁺ T cells. Therefore, our data strongly suggest that -346T is directly responsible for the predisposing effect to ALPS/DALD development by increasing SAP expression. The finding that association with -346T was detected only in males and that, among patients, males displayed significantly higher frequency of -346T than females may reflect differential usage of the -346C methylation site or other regulatory sites in males and females. This would be intriguing as a gender influence in the ALPS picture was previously reported by Maric I et al. [26] who showed that lymph nodes from male ALPS patients frequently

displayed histopathological features of sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy, that were rare in female ALPS patients.

SAP has two functional domains for protein interaction [23,27-31]. The first is a SH2 domain which binds to a unique class of cytoplasmic tyrosine-based motifs present in receptors belonging to the SLAM family; SAP binds this site with high affinity and blocks its interaction with the tyrosine phosphatase SHP-2. The second domain binds the tyrosine kinase Fyn that propagates downstream signals that are essential to the function of the SLAM family members. These signals may play an important role to develop autoimmunity and lymphadenopathy in MRL*lpr/lpr* mice since *lpr* T cells show an unusual activation of Fyn, that may support their survival [32,33]. Moreover, Fyn deficiency resulted in a marked reduction of lymphadenopathy and autoantibody production in these mice [34], that mimicked the effect of SAP deficiency.

ALPS and DALD share the clinical picture and defective Fas function, but are distinguished by DN T cell expansion that is only present in ALPS. This difference is important from a diagnostic point of view since the search for DN T cells is a first level laboratory analysis to diagnose ALPS, but it may also mark immunopathologic differences as DN T cells might play a direct role in ALPS development. Despite these differences, this work on SAP and our previous works on the *OPN* and *PRF* genes indicated that the genetic background predisposing to ALPS and DALD may be similar, since variations of these three genes predispose to both diseases. We previously suggested that the *OPN* and *PRF* gene variations cooperated with the Fas defect in slowing down the immune response switching off by inhibiting AICD and cytotoxic cell-mediated fratricide of activated immune cells respectively, that flank Fas-induced apoptosis in eliminating activated immune cells [16-18]. A similar mechanism might also be involved in the predisposing effect mediated by -346T since this variation was associated with decreased secretion of INF- γ , that is a cytokine capable to enhance FasL expression in T_H cells [35]. By contrast, the effect was not due to a direct effect on AICD and Fas-induced cell death since they were similar in T cells derived

from healthy males carrying -346C or -346T (data not shown). It is noteworthy that this picture is different from that displayed by XLP patients showing defective AICD and normal Fas-induced apoptosis [36].

The SLAM family of receptors comprise seven members: SLAM (CD150), 2B4 (CD244), CD84, CD48, NTB4 (SLAMF6 or Ly108 in the mouse), Ly9 (CD229), and CD2-like receptor activating cytotoxic cells (CRACC or CD319) [27,30,31]. Most SLAM family members form homophilic interactions, whereas 2B4, an activating receptor for NK cells and CD8⁺ cytotoxic T cells, interacts with CD48 upregulated by EBV-infected B cells; the abnormal responses to EBV infection displayed by XLP patients are probably due in part to defects of 2B4-mediated cytotoxicity. However, 2B4 seemed not to play a role in our system since 2B4-mediated cytotoxicity was similar in -346C and -346T carriers (data not shown). Moreover, no role was found for SLAM whose triggering did not influence the differential IFN- γ secretion displayed by these donors.

A general role of SAP in autoimmunity has been suggested by the finding that SAP-deficient mice are protected not only from the *lpr* disease but also from EAE and pristane-induced lupus [31]. However, this general role does not seem to involve -346C>T since we did not detect any association of this variation with MS. This makes a difference with the osteopontin and perforin gene variations that were found to be associated not only with ALPS and DALD, but also with MS and other autoimmune diseases [37-40].

In conclusion, this work suggests that high SAP expression may favor lymphoproliferation in ALPS and DALD patients and opens the way to the possibility that partial pharmacological inhibition of SAP might be beneficial to control these diseases.

Acknowledgements

U.D and M.S. designed the study. U.D. and A.C. drafted the manuscript. E.B., S.B., R.M., G.G., M.M., N.C., E.O., M.F.S., A.P. performed the experiments. C.C. and U.R. diagnosed and characterized patients. U.D and S.D. performed statistical analyses. All authors revised the manuscript. This work was supported by grants from Fondazione Cariplo Ricerca (Milano), Fondazione Amici di Jean (Torino), Fondazione Italiana Sclerosi Multipla (FISM, Genova), Fondazione Cassa di Risparmio di Cuneo (Cuneo), Associazione Italiana Ricerca Cancro (AIRC Milano), Compagnia di San Paolo n.2007.2065 (Torino), and Regione Piemonte (Piattaforme Innovative Project- IMMONC). We are grateful to Andrew Martin Garvey for patiently reviewing our paper.

References

- [1] Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-65.
- [2] Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000;407:789-95.
- [3] Dianzani U, Chiocchetti A, Ramenghi U. Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity. *Life Sci* 2003;72:2803-24.
- [4] Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995;81:935-46.
- [5] Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995;268:1347-49.
- [6] Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mountz JD. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* 1996;98:1107-13.
- [7] Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, Sneller M, et al. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 1999;98:47-58.
- [8] Lenardo MJ, Oliveira JB, Zheng L, Rao VK. ALPS - Ten Lessons from an International Workshop on a Genetic Disease of Apoptosis. *Immunity* 2010;32:291-95.
- [9] Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U, Fleisher TA, Jaffe ES, Lenardo MJ, et al. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood* 2010;116:35-40.
- [10] Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, Dale JK, Elkon KB, Rösen-Wolff A, et al. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 2001;98:194-200.

- [11] Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* 1995;16:39-43.
- [12] Dianzani U, Bragardo M, DiFranco D, Alliaudi C, Scagni P, Buonfiglio D, et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 1997;89:2871-79.
- [13] Ramenghi U, Bonissoni S, Migliaretti G, DeFranco S, Bottarel F, Gambaruto C, et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. *Blood* 2000;95:3176-82.
- [14] Campagnoli MF, Garbarini L, Quarello P, Garelli E, Carando A, Baravalle V, et al. The broad spectrum of autoimmune lymphoproliferative disease: molecular bases, clinical features and long-term follow-up in 31 patients. *Haematologica* 2006;91:538-41.
- [15] Jackson CE, Fischer RE, Hsu AP, Anderson SM, Choi Y, Wang J, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance. *Am J Hum Genet* 1999;64:1002-14.
- [16] Chiocchetti A, Indelicato M, Bensi T, Mesturini R, Giordano M, Sametti S, et al. High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 2004;103:1376-82.
- [17] Boggio E, Indelicato M, Orilieri E, Mesturini R, Mazzarino MC, Campagnoli MF, et al. Role of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in development of autoimmunity lymphoproliferation. *Haematologica* 2010;95:1897-1904.
- [18] Clementi R, Chiocchetti A, Cappellano G, Cerutti E, Ferretti M, Orilieri E, et al. Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function. *Blood* 2006;108:3079-84.
- [19] Veillette A. Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol* 2006;6:56-66.

- [20] Morra M, Silander O, Calpe S, Choi M, Oettgen H, Myers L, et al. Alterations of the X-linked lymphoproliferative disease gene SH2D1A in common variable immunodeficiency syndrome. *Blood* 2001;98:1321-25.
- [21] Sayos J, Wu C, Morra M, Wang N, Zhang X, Allen D, et al. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 1998;395:462-69.
- [22] Engel P, Eck MJ, Terhorst C. The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat Rev Immunol* 2003;3:813-21.
- [23] Schwartzberg PL, Mueller KL, Qi H, Cannons JL. SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nat Rev Immunol* 2009;9:39-46.
- [24] Komori H, Furukawa H, Mori S, Ito MR, Terada M, Zhang MC, et al. A signal adaptor SLAM-associated protein regulates spontaneous autoimmunity and Fas-dependent lymphoproliferation in MRL-Fas lpr lupus mice. *J Immunol* 2006;176:395-400.
- [25] Parolini O, Weinhäusel A, Kagerbauer B, Sassmann J, Holter W, Gadner H, et al. Differential methylation pattern of the X-linked lymphoproliferative (XLP) disease gene SH2D1A correlates with the cell lineage-specific transcription. *Immunogenetics* 2003;55:116-21.
- [26] Maric I, Pittaluga S, Dale JK, Niemela JE, Delsol G, Diment J, et al. Histologic features of sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am J Surg Pathol* 2005;29:903-11.
- [27] Poy F, Yaffe MB, Sayos J, Saxena K, Morra M, Sumegi J, et al. Crystal structures of the XLP protein SAP reveal a class of SH2 domains with extended, phosphotyrosine-independent sequence recognition. *Mol Cell* 1999;4:555-561.

- [28] Latour S, Roncagalli R, Chen R, Bakinowski M, Shi X, Schwartzberg PL, et al. Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat Cell Biol* 2003;5:149-54.
- [29] Chan B, Lanyi A, Song HK, Griesbach J, Simarro-Grande M, Poy F, et al SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat Cell Biol* 2003;5:155-60.
- [30] Detre C, Keszei M, Romero X, Tsokos GC, Terhorst C. SLAM family receptors and the SLAM-associated protein (SAP) modulate T cell functions. *Semin. Immunopathol* 2010;32:157-71.
- [31] Chan AY, Westcott JM, Mooney JM, Wakeland EK, Schatzle JD. The role of SAP and the SLAM family in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2006;18:656-64.
- [32] Katagiri T, Urakawa K, Yamanashi Y, Semba K, Takahashi T, Toyoshima K, 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* 1989;86:10064-68.
- [33] Balomenos D, Rumold R, Theofilopoulos AN. The proliferative in vivo activities of lpr double-negative T cells and the primary role of p59fyn in their activation and expansion. *J Immunol* 1997;159:2265-73.
- [34] Takahashi T, Yagi T, Kakinuma S, Kurokawa A, Okada T, Takatsu K, et al. Suppression of autoimmune disease and of massive lymphadenopathy in MRL/Mp-lpr/lpr mice lacking tyrosine kinase Fyn (p59fyn). *J Immunol* 1997;159:2532-41.
- [35] Boselli D, Losana G, Bernabei P, Bosisio D, Drysdale P, Kiessling R, et al. IFN-gamma regulates Fas ligand expression in human CD4+ T lymphocytes and controls their anti-mycobacterial cytotoxic functions. *Eur J Immunol* 2007;37:2196-204.
- [36] Snow AL, Marsh RA, Krummey SM, Roehrs P, Young LR, Zhang K, et al. Restimulation-induced apoptosis of T cells is impaired in patients with X-linked lymphoproliferative disease caused by SAP deficiency. *J Clin. Invest* 2009;119: 2976-89.

-
- [37] 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* 2005;163:172-8.
- [38] D'Alfonso S, Barizzone N, Giordano M, Chiocchetti A, Magnani C, Castelli L, et al. Two single-nucleotide polymorphisms in the 5' and 3' ends of the osteopontin gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000;52:539-47.
- [39] Cappellano G, Orilieri E, Comi C, Chiocchetti A, Bocca S, Boggio E, et al. Variations of the perforin gene in patients with multiple sclerosis. *Genes Immun* 2008;9:438-44.
- [40] Orilieri E, Cappellano G, Clementi R, Cometa A, Ferretti M, Cerutti E, et al. Variations of the perforin gene in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2008;57:1078-83.

Table 1 Allele frequencies of different SNPs in *SH2D1A* in male ALPS/DALD patients and healthy controls

	-346C>T		-494G>A		-631G>A			
Allele	Controls^a	Patients	Allele	Controls	Patients	Allele	Controls	Patients
C	235 (64%)	12 (39%)	G	215 (58%)	22 (71%)	G	234 (63%)	12 (39%)
T	134 (36%)	19 (61%)	A	154 (42%)	9 (29%)	A	135 (37%)	19 (61%)
Total	369	31		369	31		369	31
	OR: 2.78 (1.24-6.30)		NS^c		OR: 2.74 (1.22-6.22)			
	p=0.01^b				p=0.01			

a: number of subjects proportions are shown in the brackets.

b: patients vs controls; OR: Odds Ratio (95% confidence interval); p value uncorrected for number of comparisons.

c: not significant

Table 2 Allele frequencies of different SNPs in *SH2D1A* in female ALPS/DALD patients and healthy controls

-346C>T			-494G>A			-631G>A		
Allele	Controls ^a	Patients	Allele	Controls	Patients	Allele	Controls	Patients
C	206 (62%)	27 (69%)	G	191 (58%)	25 (59%)	G	203 (61%)	26 (66%)
T	124 (38%)	13 (31%)	A	139 (42%)	15 (41%)	A	127 (38%)	14 (34%)
Total	330	40		330	40		330	40

Genotype	Controls ^a	Patients	Genotype	Controls	Patients	Genotype	Controls	Patients
CC	67 ^b (40%)	9 (45%)	GG	55 (33%)	8 (40%)	GG	65 (40%)	9 (45%)
CT	72 (44%)	9 (45%)	GA	81 (49%)	9 (45%)	GA	73 (44%)	8 (40%)
TT	26 (16%)	2 (10%)	AA	29 (18%)	3 (15%)	AA	27 (16%)	3 (15%)
Total	165	20		165	20		165	20

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

b: number of subjects; proportions are shown in the brackets.

Table 3 Linkage disequilibrium pattern of the three SNPs

	-631G>A	-494G>A	-346C>T
-631G>A		D'=1 $r^2=0.5$	D'=0.96 $r^2=0.8$
-494G>A	D'=1 $r^2=0.5$		D'=0.95 $r^2=0.46$
-346C>T	D'=0.96 $r^2=0.8$	D'=0.95 $r^2=0.46$	

Figure Captions

Fig. 1. SAP expression at the mRNA level in activated PBMC derived from healthy males and patients carrying -346C or -346T.

PBMC from male patients (-346C: N=5, -346T: N=4) and healthy controls (-346C: N=10, -346T: N=10) were cultured in the presence of PHA and IL-2 for 3 days. Quantification of the SAP mRNA was evaluated by Real Time PCR. 100% expression was the median expression level detected in -346C samples in each experiment; horizontal lines show the median values and boxes the interquartile ranges; statistical analyses were performed with the non-parametric Mann-Whitney U test, (**p<0.01; *p<0.05).

Fig. 2. SAP expression at the mRNA level in T_H, CTL, and NK cells derived from healthy males carrying -346C or -346T by positive and negative purification.

Cell subsets were positively purified from PHA-activated PBMC (-346C: N=6, -346T: N=6) by magnetic microbeads (*left panel*) or negatively purified from fresh resting PBMC (-346C: N=5, -346T: N=5) and then cultured in the presence of PHA and IL-2 for 3 days (*right panel*). Quantification of the amount of the SAP mRNA was evaluated by Real Time PCR and data are expressed as in Figure 1.

Fig. 3. SAP -346C methylation in PBMC, CTL, and NK cells derived from healthy males.

Quantitative analysis of DNA methylation at the -346C site in amplified bisulphite CT-converted genomic DNA from the cells obtained from the -346C healthy males as described for the right panel of Figure 2. The methylation level is expressed as median values and interquartile ranges of the relative proportion of the unconverted methylated C and the T-converted unmethylated C; statistical analyses were performed with the non-parametric Mann-Whitney U test, (*p<0.05).

Fig. 4. SAP expression at the protein level in PBMC derived from healthy males carrying -346C or -346T.

PBMC from healthy males (-346C: N=10, -346T: N=10) were cultured in the presence of PHA and IL-2 for 5 days and then SAP expression was evaluated by western blot. *Left panel:* Representative western blots of two -346C and two -346T samples. *Right panel:* Densitometric quantification of SAP of results from all experiments. 100% expression was the median expression detected in the -346C samples in each experiment; horizontal lines show the median values, boxes the interquartile ranges; statistical analysis was performed with the Mann-Whitney U test, (* $p < 0.05$).

Fig. 5. IFN- γ production and proliferation in T cells from healthy males carrying -346C or -346T.

PBMC from healthy controls (-346C: N=8, -346T: N=8) were cultured for 9 days in the presence of PHA and IL-2, then they were restimulated with anti-CD3 mAb for 3 days in the presence and absence of anti-SLAM mAb. Then, IFN- γ secretion (*left panel*) and cell proliferation (*right panel*) were measured. Horizontal lines show the median values, boxes the interquartile ranges; statistical analysis was performed with the Mann-Whitney U test, (* $p < 0.05$).

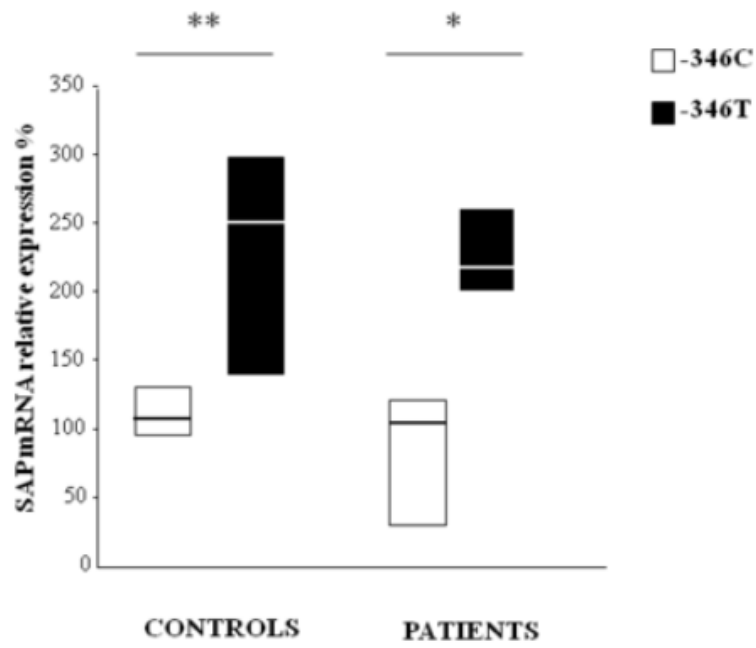


Figure 1

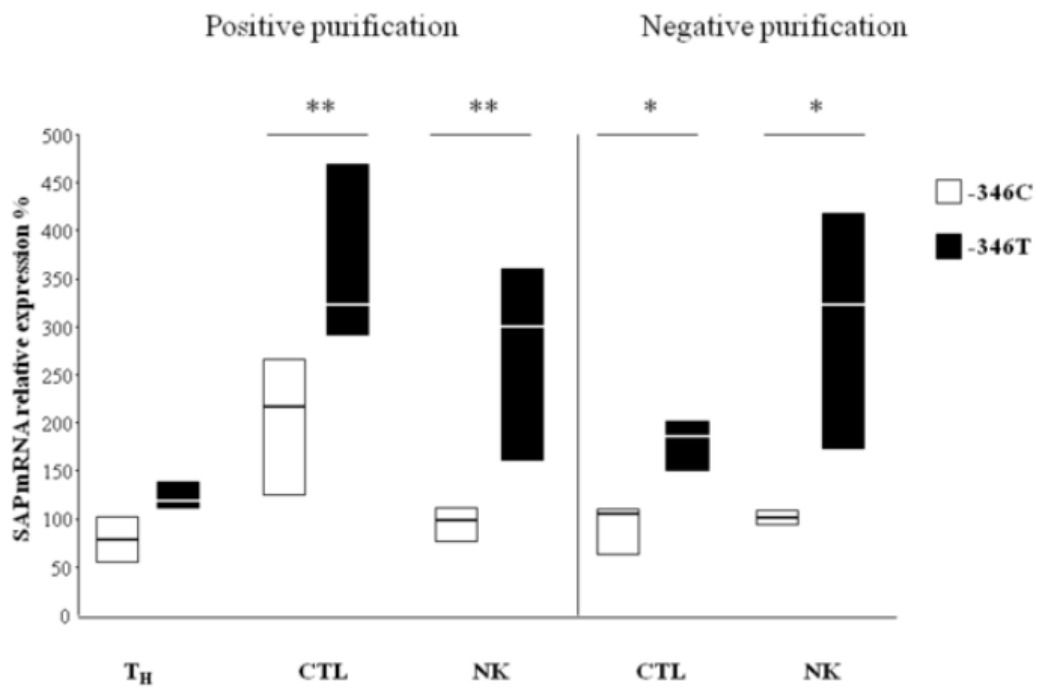
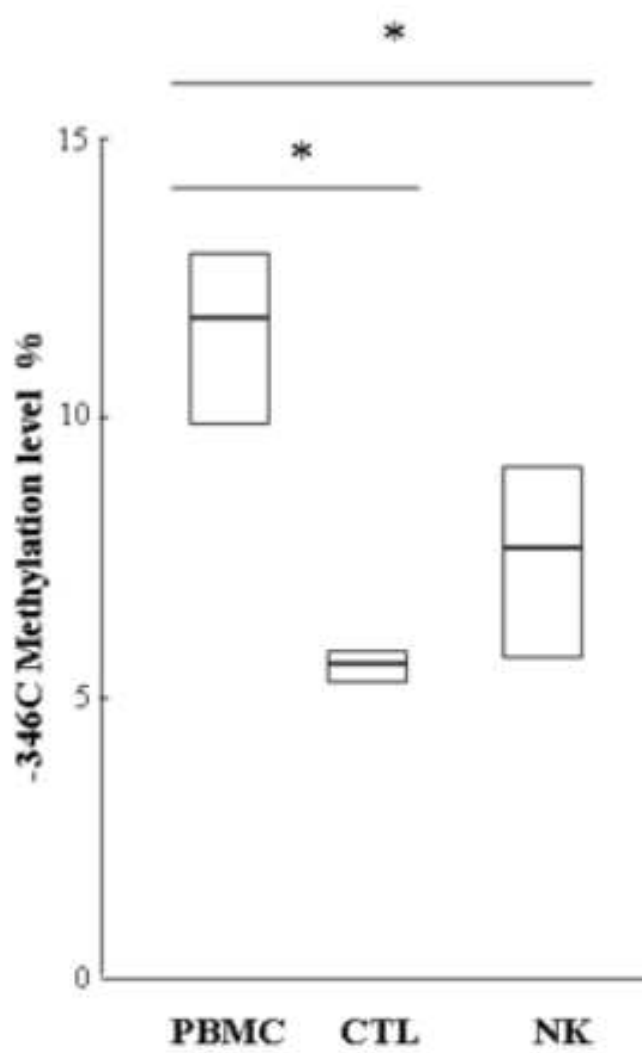


Figure 2

**Figure 3**

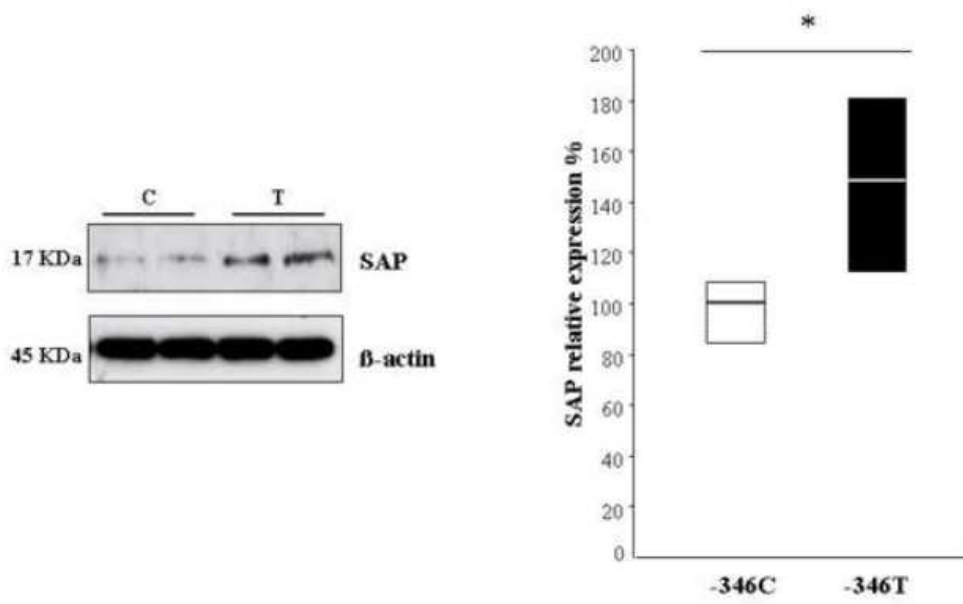


Figure 4

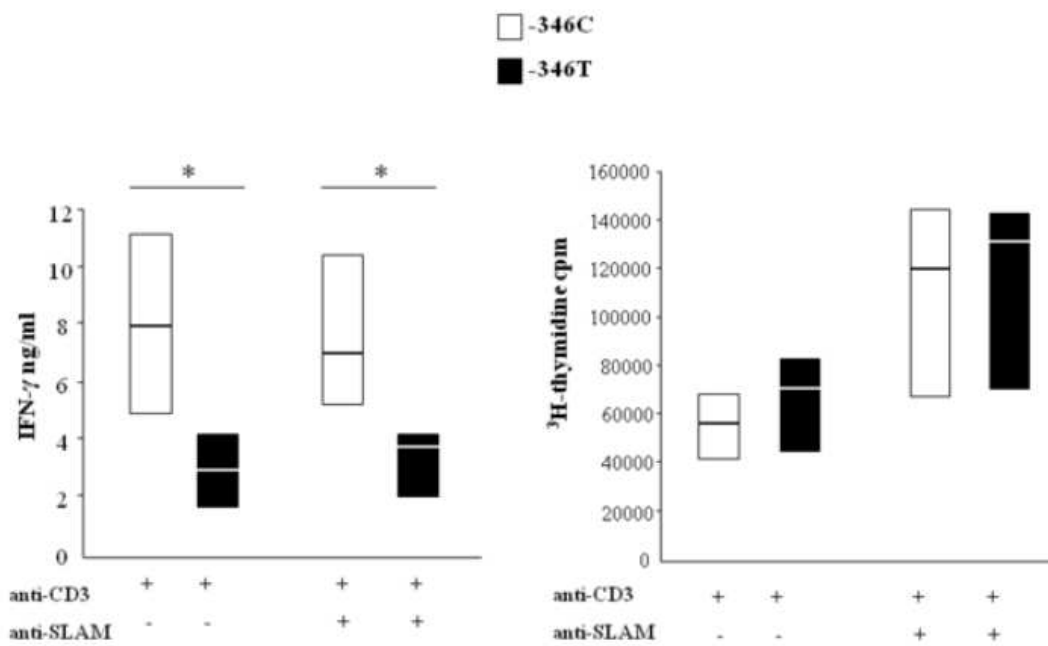


Figure 5

DELETERIOUS MUTATIONS OF THE *FAS*, *XIAP* AND *UNC13D* GENES IN A PATIENT WITH A COMPLEX LYMPHOPROLIFERATIVE PHENOTYPE

Matteo Melensi^a PhD, Maurizio Aricò^b MD, Elena Boggio^a PhD, Maria Felicia Soluri^a PhD, Irma Dianzani^a MD PhD, Ugo Ramenghi^c MD, Umberto Dianzani^a MD PhD and Annalisa Chiocchetti^a MD PhD.

From ^aInterdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD) and Department of Medical Sciences, "A. Avogadro" University of Eastern Piedmont, Novara, Italy; ^bDepartment of Pediatric Hematology Oncology, Meyer Children Hospital, Firenze, Italy; ^cDepartment of Pediatrics, University of Torino, Torino, Italy.

Address correspondence to: Dott. Annalisa Chiocchetti, IRCAD-Department of Medical Sciences, Via Solaroli, 17, I-28100, Novara, Italy. Tel:+390321660668 – Fax +390321620421 – e mail: annalisa.chiocchetti@med.unipmn.it

This work was supported by Associazione Italiana Ricerca sul Cancro (AIRC, Milano), Regione Piemonte (IMMONC Piattaforme Innovative), Fondazione Italiana Sclerosi Multipla (FISM, Genova), Fondazione Cariplo (Milano), Fondazione Amici di Jean (Torino), Banca del Piemonte (Torino), Grant: "Antonio Pinzino-Associazione per la Ricerca sulle Sindromi Emofagocitiche (ARSE), Italian Ministry of Health, Bando Malattie Rare 2008, A.O.U. Meyer.

Total word count: 1205

Capsule summary: We describe a patient with monoallelic deleterious mutations in the *FAS*, *XIAP*, and *UNC13D* genes, and displaying a complex phenotype with features of the different lymphoproliferative diseases caused by mutations of these genes.

Key words: ALPS; FHL; XLP; *FAS*; *XIAP*; *MUNC13-4*

Abbreviations:

ALPS (Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome)
DN T (Double-Negative T cells)
EBV (Epstein Barr Virus)
FHL (Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis)
HMC-1 (Human Mast Cells-1)
NK (Natural Killer)
NKT (Natural Killer-T)
OPN (Osteopontin)
PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell)
PRF1 (Perforin)
SAP (Slam Associating Protein)
SNP (Single Nucleotide Polymorphism)
XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)
XLP (X-linked Lymphoproliferative)
RA (Rheumatoid Arthritis)

To the editor

Lymphoproliferation is a hallmark of three inherited diseases, autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS), familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL), and X-linked lymphoproliferative disease (XLP). ALPS is due to defective function of the Fas death receptor causing defective apoptosis of activated lymphocytes and it often displays autoimmune manifestations. FHL is due to defective function of perforin involved in cell-mediated cytotoxicity and is characterized by sepsis-like bouts due to massive macrophage activation. XLP is mostly due to defective function of Slam associating protein (SAP) involved in Natural Killer (NK) cell costimulation causing a defect of these cells and increased susceptibility to Epstein-Barr virus (EBV) infection. A XLP variant is due to defective function of the anti-apoptotic molecule X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP). The causal genes, inheritances, and diagnostic criteria are shown in the Table I.

This work describes a patient with a complex picture sharing clinical and genetic features of these diseases and summarized in Table I. From the age of 6 months, he displayed unexplained massive splenomegaly and lymphadenopathy and, from 4 years old, recurrent severe thrombocytopenia, autoimmune neutropenia and anemia. He had multiple bouts of septic-like fever that were only responsive to steroids. His immunoglobulin levels were in the normal range, but included anti-nucleus and anti-phospholipid antibodies. IgG antibodies against EBV were also evident, whereas IgM, tested at every clinical evaluation, were always negligible. In the peripheral blood, TCR $\alpha\beta^+$ CD4/CD8 double negative (DN) T cells (hallmark of ALPS) were slightly expanded (maximal values: 3.5% of T cells). Moreover, he displayed decreased proportions of Natural Killer-T (NKT) (CD3 $^+$ TCR $\alpha_24\beta_{11}^+$) and NK (CD16 $^+$ CD56 $^+$) cells (patient vs 5th percentile of controls: NKT=0.01% vs 0.04%; NK=1.4% vs 5%, $p<0.05$), whereas B (CD19 $^+$), T helper (CD3 $^+$ CD4 $^+$) and T cytotoxic (CD3 $^+$ CD8 $^+$) cells were in the normal range (data not shown). At the age of 9, his spleen was removed. He died 3 yrs later of sudden uncontrollable disseminated intravascular coagulation.

Because of this picture, we sequenced the following genes: *FAS* and *CASP10* involved in ALPS^{1,2,3}; *PRF1*, *UNC13D*, and *STX11* involved in FHL⁴; *SAP* and *XIAP* involved in XLP^{5,6}. Moreover, we typed variations of the Osteopontin (*OPN*) gene previously found to be predisposing factors for ALPS development³.

The patient carried three monoallelic mutations in *FAS* (755G>A), *XIAP* (1189delA), and *UNC13D* (2768C>G), which were not detected in 100 normal donors, and the *OPN* 1239A>C single nucleotide polymorphism (SNP) that was previously associated with ALPS. No variation was found in the other genes. The *FAS*, *XIAP*, and *UNC13D* mutations were inherited from the mother who was heterozygous for each of them. The father transmitted the *OPN* SNP.

The *FAS* mutation (exon 7) was predicted to cause a E178K amino acid substitution in the intracellular portion of the protein, adjacent to the death domain. In the patient's peripheral blood mononuclear cells (PBMC), Fas expression was decreased (Fig 1A, left panel) and Fas function was either defective or borderline in repeated analyses. To further analyze the functional effect of the variation, the wild-type (Fas^{WT}) and the mutated (Fas^{E178K}) Fas cDNAs, fused to the FLAG tag, were transfected in 293T cells. Western blot analysis showed that both cDNA were similarly expressed. However, caspase-8 activity, triggered by Fas signaling, was lower in the cells transfected with Fas^{E178K} than in those transfected with Fas^{WT} (Fig 1A, middle and right panels).

The *XIAP* mutation (exon 6) was predicted to cause a frame-shift resulting in premature termination codon and thus targeted by nonsense-mediated mRNA decay⁷. In the patient's PBMC, western blot analysis showed that XIAP was barely detectable and etoposide-induced activation of caspase-9, a target of XIAP inhibition, was increased (Fig 1B).

UNC13D encodes for Munc13-4 involved in secretion of perforin. The *UNC13D* mutation (exon 29) was predicted to cause a S923C amino acid substitution. At the time of its detection, the patient was deceased and expression of the Munc13-4 protein in his cells could not be evaluated, but in silico analysis using the POLYPHEN software classified the variation as deleterious. To confirm this hypothesis, the wild type (Munc13-4^{WT}) and the mutant (Munc13-4^{S923C}) cDNAs were cloned

fused to the SV5-epitope tag, and transfected into the Human Mast Cells (HMC)-1 mastocytoma cell line. Western blot analysis showed that both constructs were expressed at similar levels (Fig 1C, left panel). Since a key step in Munc13-4 function is its interaction with Rab27a, involved in fusion of the secretory granules with the plasma membrane⁸, we assessed this interaction in the transfected cells by co-immunoprecipitation. Densitometric analysis showed that Rab27a co-precipitated substantially higher amounts of Munc13-4^{wt} than Munc13-4^{S923C} (Fig 1C, right panel).

These deleterious mutations of *FAS*, *UNC13D*, and *XLAP* may account for the patient's complex phenotype which fit the diagnostic criteria of ALPS, but also had certain features of XLP and FHL, such as decreased numbers of NK cells and bouts of macrophage activation, respectively (Table I). All these variations were inherited from the mother (I:1) who displayed rheumatoid arthritis but no signs of these diseases. The difference in clinical presentation between mother and son may be related to the fact that the mutation in *XLAP* was heterozygous in the mother but hemizygous in the son (Fig 1D). Lyonization may also explain the different *FAS* function in mother and son. The mother displayed normal *Fas* function which may be explained by the opposing effects of the *FAS* and *XLAP* mutations on apoptosis in those cells that expressed the mutant *XIAP*. These cells, showing a normal *Fas* function, would mask the expected reduced *Fas* function of cells expressing the WT *XIAP* allele. On the other hand, the abnormal *Fas* function of the patient's cells could be due to an additional defect in the *Fas* pathway inherited from the father, who was healthy, but showed a measurable defect of *Fas* function. The father (I:4) transmitted also the *OPN* SNP that may contribute to ALPS by increasing serum levels of this anti-apoptotic cytokine².

The phenotype of the patient's maternal aunt (I:2) who displayed unexplained lymphadenomegaly and defective function of *Fas*, and carried the *FAS* mutation and the *OPN* SNP, shows that the *Fas* mutation "per se" had a mild, but evident clinical effect. Finally, the maternal uncle (I:3) was healthy and carried the *UNC13D* mutation (Fig 1D).

The phenotype reported by this patient shows that mutations of the *FAS*, *UNC13D*, and *XLAP* genes might cooperate in disrupting the ability of the immune system to shut off and interfering with the

anti-viral response. These processes involve both Fas and NK/NKT cell function whose cytotoxicity is crucial for the clearance of virus-infected cells and fratricide of activated immune cells^{6,9}. Persistence of viral infection and inability to switch off the immune response may contribute to the lymphocyte accumulation, the autoimmune reactions, and the bouts of macrophage activation displayed by the patient. This possibility is in line with our previous reports suggesting that mutations of *PRF1*, that cause FHL when combined with a second *PRF1* variation, may act as disease modifiers for ALPS in subjects carrying genetic defects hitting Fas function².

Disclosure of potential conflict of interest: The authors have declared that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

Annalisa Chiocchetti designed the study. Umberto Dianzani drafted the manuscript. Matteo Melensi, Elena Boggio, Maria Felicia Soluri performed the experiments. Maurizio Aricò and Ugo Ramenghi diagnosed and characterized the patient. Irma Dianzani performed statistical analyses. All authors revised the manuscript.

REFERENCES

1. Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U, Fleisher TA, Jaffe ES, Lenardo MJ, et al. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood* 2010;116:e35-e40.
2. Clementi R, Chiocchetti A, Cappellano G, Cerutti E, Ferretti M, Orilieri E, et al. Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function. *Blood* 2006;108:3079-84.
3. Chiocchetti A, Indelicato M, Bensi T, Mesturini R, Giordano M, Sametti S, et al. High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 2004;103:1376-82.
4. Gholam C, Grigoriadou S, Gilmour KC, Gaspar HB. Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis: advances in the genetic basis, diagnosis and management. *Clin Exp Immunol* 2011;163:271-83
5. Komori H, Furukawa H, Mori S, Ito MR, Terada M, Zhang MC, et al. A signal adaptor SLAM-associated protein regulates spontaneous autoimmunity and Fas-dependent lymphoproliferation in MRL-Faslpr lupus mice. *J Immunol* 2006;176:395-400.
6. Rigaud S, Fondanèche MC, Lambert N, Pasquier B, Mateo V, Soulas P, et al. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* 2006;444:110-4.
7. Bhuvanagiri M, Schlitter AM, Hentze MW, Kulozik AE. NMD: RNA biology meets human genetic medicine. *Biochem J*. 2010;3:352-77.
8. Ménager MM, Ménasche G, Romao M, Knapnougel P, Ho CH, Garfa M, et al. Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nature Immunology* 2007;8:257-67.
9. Lünemann A, Lünemann JD, Münz C. Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity. *Mol Med* 2009;15:352-8.

TABLE I. Revised diagnostic criteria for ALPS, FHL and XLP.

		DIAGNOSTIC CRITERIA	Pt [*]	
ALPS [†]	Mutated genes [‡]	Fas (ALPS-Fas)	X	
		Fas (ALPS-sFas)		
		FasL (ALPS-FasLg)		
		CASP10 (ALPS-casp)		
	Clinical criteria	Required:		
		Lymphadenopathy and/or splenomegaly	X	
		Elevated levels of TCRαβ ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ double negative T cells	X	
		Accessory:		
		<i>Primary</i>		
		Defective lymphocyte apoptosis	X	
		Gene mutation	X	
		<i>Secondary</i>		
		sFASL levels (>200 pg/mL)		
		Interleukin-10 levels (>20 pg/mL)		
		Vitamin B12 levels (>1500 ng/L)	X	
Interleukin-18 levels > 500 pg/mL	X			
Autoimmune cytopenias AND polyclonal hypergammaglobulinemia	X			
Typical immunohistological findings	X			
Family history of lymphoproliferation	X			
FHL [§]	Mutated genes	Unknown (FHL1)		
		PRF1 (FHL2)		
		UNC13D (FHL3)	X	
		STX1A (FHL4)		
		STXBP2 (FHL5)		
	Clinical criteria	Fever	X	
		Splenomegaly	X	
		Cytopenia (2/3 cell lineages)	X	
		Hypertriglyceridemia and/or hypofibrinogenemia		
		Hemophagocytosis in BM, spleen or LN		
Hyperferritinemia				
High levels of soluble IL2RA				
Low/absent NK activity [¶]	X			
XLP	Mutated genes	SAP (XLP1)		
		XLAP (XLP2)	X	
	Clinical criteria	Fulminant infectious mononucleosis		
		HLH from EBV infection (or other)		
		Hypogammaglobulinemia/CVID		
		Malignant B-cell lymphoma		
Family history of maternally related males with XLP				

* diagnostic criteria of our patient are shown by ticked boxes

† diagnosis: both required criteria + 1 primary accessory criterion; probable diagnosis: both required criteria + 1 secondary accessory criterion

‡ disease subtypes are shown in the brackets

§ diagnosis: biallelic gene mutations and/or 5 of the clinical criteria

¶ NK activity was not evaluated, but NK cell counts were low

|| diagnosis: males with gene mutation and any of the clinical criteria

Figure Legend**FIG 1. Characterization of the *FAS*, *XIAP*, and *UNC13D* variations.**

A) *FAS*: Fas expression in activated PBMC from the patient (Pt) and two control donors evaluated by surface immunofluorescence and flow cytometry (left panel), and in 293T cells transfected with the mock, wild-type (WT), and mutated (E178K) constructs (middle panel) evaluated by Western blot; right panel: caspase-8 activity in the transfected cells. B) *XIAP*: Western blot analysis of XIAP and caspase-9 expression in PBMC from the patient (Pt) and two control donors C) *MUNC13-4*: Western blot analysis of Munc13-4 expression in HMC-1 cells transfected with the mock, WT, and mutated (S923C) constructs (left panel); Western blot analysis of the transfected Munc13-4 co-immunoprecipitating with the active form of Rab27a and its densitometric analysis (right panel). D) Inheritance of *FAS*, *XIAP*, *UNC13D* and *OPN* variations and defective (D) Fas function in patient's family.

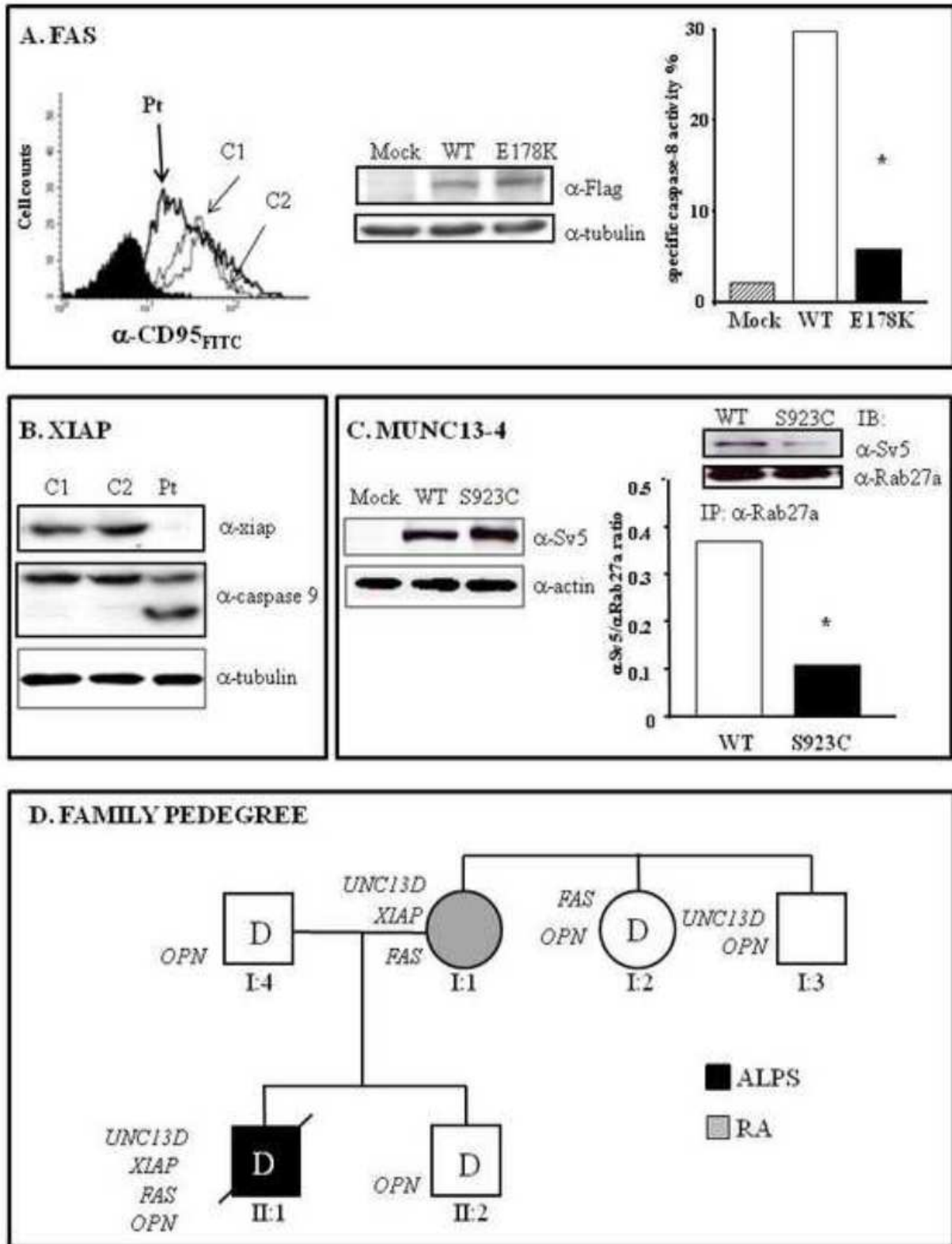


Fig 1