



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Direttore della Scuola: Prof. Andrea Fausto Piana

**INDIRIZZO IN GENETICA MEDICA, MALATTIE METABOLICHE E
NUTRIGENOMICA**

XXVIII CICLO

**Ricerca delle varianti genetiche implicate nella regolazione dei
livelli delle immunoglobuline e comprensione dei meccanismi
biologici nell'eziopatogenesi delle patologie autoimmuni
tra cui la Sclerosi Multipla**

Direttore:

Prof. Andrea Fausto Piana

Tutor:

Prof. Francesco Cucca

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Monia Lobina

Co-Tutor:

Dott. Edoardo Fiorillo

Anno Accademico 2014 - 2015

INDICE

INDICE	1
INTRODUZIONE	2
Autoimmunità e Sclerosi Multipla	6
Fisiopatologia della Sclerosi Multipla	8
Epidemiologia della Sclerosi Multipla	13
Genetica della Sclerosi Multipla	15
Cellule B e anticorpi	17
MATERIALI E METODI	23
Misurazioni cellulari	25
Dosaggio delle molecole solubili	27
Immunoglobuline	27
B cell activating factor (sBAFF)	29
Stima dell'ereditabilità	29
Caratterizzazione genetica della coorte ProgeNIA	30
Analisi di associazione	31
Ricerca delle associazioni coincidenti	32
RISULTATI E CONCLUSIONI	32
BIBLIOGRAFIA	37

INTRODUZIONE

Gli studi di associazione sull'intero genoma (GWAS) hanno mostrato come molti geni siano implicati nella insorgenza di patologie autoimmuni, sebbene i meccanismi biologici alla base di tali associazioni genetiche sono poco chiari. Recentemente è emerso che la stima del 5.3% della prevalenza delle malattie autoimmuni, basata sui registri di ospedalizzazione, sia stata soggetta ad una importante sottostima, ed attualmente le patologie autoimmuni colpiscono nel mondo tra il 7,6 ed il 9,4 % della popolazione (Davis M. M. *et al.*, *Immunity* 2008, Cooper G. S. *et al.*, *J Autoimmun* 2009). Un recente studio condotto sulla popolazione sarda, dimostra che in Sardegna la prevalenza di alcune malattie tra cui la Sclerosi Multipla (SM) è più elevata rispetto al resto d'Italia e corrisponde a 224 casi su 100000 abitanti (Sardu C. *et al.*, *PLoS One* 2012). In questo contesto abbiamo intrapreso lo studio dei meccanismi biologici alla base dell'insorgenza delle patologie multifattoriali a carico del sistema immunitario basandoci sul presupposto che queste malattie siano la risultante di diversi tratti quantitativi influenzati da varianti genetiche, ognuna delle quali fornisce un modesto contributo alla patologia.

Lo studio è stato condotto nell'ambito di un progetto più ampio denominato ProgeNIA/SardiNIA che si avvale della partecipazione di circa 7000 volontari originari di quattro paesi dell'Ogliastra: Lanusei, Elini, Arzana, Ilbono (Pilia G. *et al.*, *PLoS Genet* 2006). Il progetto ProgeNIA è uno studio longitudinale nato nel 2001 in seguito alla collaborazione tra l'Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRGB-CNR) di Cagliari, ed il laboratorio statunitense di Genetica del National Institute on Aging del National Institute of Health) (NIA-NIH) e si propone di ricercare varianti genetiche ed esposizioni a fattori ambientali in grado di influenzare lo stato di salute delle persone e le condizioni cliniche associate all'invecchiamento. A tal fine sono stati studiati centinaia di tratti quantitativi biomedici tra i quali i tratti cardiovascolari, muscolo scheletrici, biometrici e biochimici oltre che da indagini ecografiche condotte su diversi organi tra cui fegato, reni,

milza, tiroide, carotide e cuore. La popolazione sarda, e in particolare quella appartenente a questa area geografica, risulta particolarmente adatta per gli studi genetici di tratti complessi in quanto costituisce un macro isolato genetico con un corredo genico che si inquadra perfettamente nell'ambito di quello europeo con delle differenze nelle frequenze alleliche (Francalacci P. *et al.*, Science 2013). Il fatto di aver vissuto per un lungo periodo di tempo in una condizione di isolamento sia geografico che culturale, ha favorito il verificarsi di diversi "effetti fondatori" che hanno determinato una variabilità genetica omogenea nelle differenti macro-aeree dell'isola e la formazione di un differente ed unico pool genetico caratterizzato dalla presenza di alcune varianti genetiche originali, in quanto già presenti negli individui che popolavano la Sardegna più di 15.000 anni fa, ed al contempo rare o assenti in altre popolazioni circostanti. Queste caratteristiche, rendono i Sardi una popolazione ideale sia per estensivi studi di catalogazione della variabilità umana e sia per la dissezione genetica di patologie complesse che preveda l'impiego di studi di associazione su tutto il genoma. Infatti, alcune delle varianti fondatrici sarde identificano delle regioni genetiche che contengono le varianti di predisposizione per malattie comuni. Tra le malattie autoimmuni che colpiscono la popolazione sarda ha sicuramente un posto di rilievo la SM, sia per l'alta incidenza rispetto al resto d'Italia e di buona parte d'Europa, sia perché è una malattia altamente invalidante, caratterizzata inoltre da un elevato costo sociale, dal lungo decorso della malattia con conseguente perdita di produttività e dell'elevato costo delle terapie farmacologiche.

L'obiettivo del nostro studio è quello di individuare i geni/varianti associati a variazioni di tratti immunologici che siano anche dei fattori genetici di predisposizione per patologie. Questo approccio ci permette di capire le cause biologiche che contribuiscono all'insorgenza delle patologie e viene attuato mediante un studio multi stadio che include a) i dati di associazione dei tratti quantitativi immunologici ottenuti dallo studio sulla coorte ProgeNIA e b) i dati di associazione con la malattia ottenuti dallo studio caso controllo sulla SM in Sardegna oltre che da database pubblici. In dettaglio, l'approccio di studio si articola nella quantificazione di

Dott.ssa Monia Lobina. *Ricerca delle varianti genetiche implicate nella regolazione dei livelli delle immunoglobuline e comprensione dei meccanismi biologici nell'eziopatogenesi delle patologie autoimmuni tra cui la Sclerosi Multipla*. Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche. Indirizzo in Genetica Medica, Malattie Metaboliche e Nutrigenomica. Università degli Studi di Sassari.

parametri immunologici (cellule circolanti, molecole solubili nel siero) sulla coorte ProgeNIA che è stata geneticamente caratterizzata ad un livello di risoluzione estremamente elevato, nella stima dell'ereditabilità dei parametri misurati per valutare il contributo genetico alla loro variazione, nella ricerca delle varianti genetiche che influenzano i livelli di tali tratti mediante una batteria di Studio di Associazione sull'Intero Genoma (GWAS) ed infine nella comprensione del ruolo della variazione dei tratti immunologici sull'insorgenza delle patologie autoimmuni. Questo legame biologico tra il tratto e la patologia emerge solo in presenza di associazioni coincidenti e viene ricercato mediante la consultazione sistematica di database pubblici o sulla base di dati generati nei laboratori del nostro stesso istituto ottenuti grazie a casistiche indipendenti dalla coorte ProgeNIA tra cui quella di ~3000 casi di sclerosi multipla e 3500 controlli sani. L'analisi dei tratti quantitativi nella popolazione generale presenta numerosi vantaggi rispetto al comune approccio di studio caso-controllo, poiché consente di lavorare in presenza di un'ampia casistica e soprattutto di non essere influenzati da fattori confondenti come le terapie farmacologiche in atto.

Sulla base di questo, abbiamo intrapreso lo studio di numerose molecole tra cui le immunoglobuline IgA, IgM, IgG e le sue sottoclassi IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, le cellule T, le cellule B, le cellule Natural Killer ed i monociti che sono implicate nell'eziopatogenesi di patologie autoimmuni come ipotizzato da diversi studi. Come noto, i geni associati con le patologie complesse non hanno una chiara appartenenza ad un pathway biologico specifico, infatti, fino ad ora il collegamento tra varianti associate e patologia è spesso criptico nonostante gli sforzi della comunità scientifica inclusi i consorzi multicentrici. Basti pensare che attualmente sono stati identificati 110 loci associati alla SM senza delle indicazioni biologiche sulla classe cellulare o sui pathway biochimici implicati nella sua insorgenza da considerare come punti di intervento specifici per applicazioni farmacologiche. Da notare che questo sbilanciamento nelle conoscenze rappresentato dall'impatto degli studi GWAS in contrapposizione alla mancanza di un potenziale legame con le relative malattie per una

Dott.ssa Monia Lobina. *Ricerca delle varianti genetiche implicate nella regolazione dei livelli delle immunoglobuline e comprensione dei meccanismi biologici nell'eziopatogenesi delle patologie autoimmuni tra cui la Sclerosi Multipla.* Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche. Indirizzo in Genetica Medica, Malattie Metaboliche e Nutrigenomica. Università degli Studi di Sassari.

esplorazione clinica, non è un evento limitato alla SM ma si allarga ad altre patologie come il diabete di tipo I e la malattia di Crohn. Quest'ultima rappresenta la forma cronica recidivante-remittente dell'Inflammatory Bowel Disease, causata da una risposta immunologica aberrante nei confronti dei batteri intestinali commensali. La malattia di Crohn è stata un grande beneficiario degli studi GWAS grazie a 140 loci di rischio identificati (Jostins L. *et al.*, Nature 2012), tuttavia solo uno di essi è stato correlato con la clinica della malattia (Helio T. *et al.*, Gut 2003).

Mediante l'analisi di associazione genetica sull'intero genoma dei livelli sierici di alcune classi di immunoglobuline è emersa una variante nel gene *TNFSF13B*. La successiva consultazione del nostro dataset di SM ha mostrato che la stessa variante risultava associata alla patologia. Il gene codifica per la proteina BAFF (B cell activating factor) nota per il suo ruolo nella omeostasi, nella sopravvivenza, nella proliferazione e nello switching isotipico delle cellule B (Castigli E. *et al.*, JEM 2005). Abbiamo successivamente proceduto alla quantificazione della proteina in forma solubile (sBAFF) anch'essa biologicamente attiva così come la forma legata alla membrana, su un campione di circa 3000 volontari della coorte ProgeNIA. Tale dosaggio ha confermato che i livelli di tale proteina sono fortemente influenzati dalla variante associata alla patologia, e mediante l'incrocio dei dati ottenuti grazie allo studio genetico sulla regolazione delle cellule del sistema immunitario ~3000 volontari effettuato dal nostro stesso gruppo di lavoro (Orrù V. *et al.*, Cell 2013), abbiamo osservato che la stessa variante influenza anche i livelli delle cellule B. Infine, gli studi di associazione sull'intero genoma sui livelli dei monociti circolanti, ottenuti dal dosaggio sulla coorte ProgeNIA attraverso un analizzatore ematologico automatico, hanno mostrato come la stessa variante determini una riduzione del numero di tali cellule. Nel complesso i risultati di associazione coincidente tra i tratti immunologici e la patologia SM, ci permettono di attribuire ai tratti immunologici in oggetto rappresentati dalla proteina BAFF, dalle IgA, dalle cellule B e dai monociti un ruolo causale

nella genesi della malattia generando delle robuste ipotesi biologiche per successivi studi funzionali.

AUTOIMMUNITÀ E SCLEROSI MULTIPLA

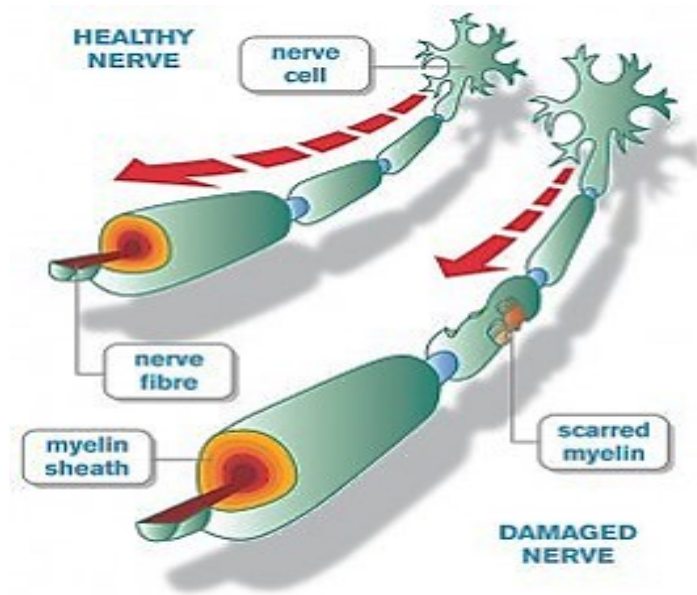
L'autoimmunità rappresenta un evento biologico legato ad anomalie dei processi fisiologici di induzione e di mantenimento della tolleranza da parte del sistema immunitario nei confronti del "self". La "tolleranza immunologica" non è altro che la mancata responsività a un antigene indotta da una precedente esposizione a quello stesso antigene. La tolleranza agli antigeni "self" è una proprietà fondamentale del sistema immunitario. Gli individui normali sono tolleranti verso i propri antigeni (self) perché i linfociti che riconoscono gli antigeni self vengono uccisi o inattivati oppure indotti a cambiare la loro specificità. In assenza di tolleranza si sviluppano risposte immunitarie verso gli antigeni autologhi che prendono il nome di malattie autoimmuni. La tolleranza può essere indotta in linfociti self-reattivi immaturi nei siti linfoidi centrali (tolleranza centrale) o in linfociti maturi in siti periferici (tolleranza periferica). La tolleranza centrale assicura che il repertorio di linfociti maturi non riconosca gli antigeni self presenti negli organi linfoidi primari tuttavia non può contare nella mancata risposta ad antigeni espressi solamente in periferia, questo tipo di tolleranza è mantenuta da meccanismi periferici. I meccanismi centrali si verificano per mezzo della selezione negativa che permette l'eliminazione dei linfociti T e B con un'elevata affinità per gli antigeni autologhi attraverso tre meccanismi: 1) morte cellulare per apoptosi nota come "delezione clonale"; 2) modificazione dei recettori che altera la capacità di riconoscere antigeni self, processo noto come "editing del recettore" che avviene nelle cellule B immature; 3) sviluppo di linfociti T regolatori che migrano in periferia e prevengono risposte agli antigeni self. I meccanismi periferici regolano le risposte dei linfociti maturi rendendoli incapaci di rispondere agli antigeni self attraverso: 1) la morte per apoptosi; 2) l'inattivazione funzionale della cellula nota come "anergia" la quale si verifica quando un peptide antigenico è presentato in assenza di molecole costimolatorie o

quando i linfociti T specifici per un determinato antigene vengono in contatto con una forma mutata dell'antigene; 3) la soppressione dell'attivazione linfocitaria e delle funzioni effettrici ad opera dei linfociti ad azione regolatoria. Appare chiaro che la inadeguatezza o l'alterazione dei meccanismi normalmente responsabili del mantenimento della tolleranza immunologica possono determinare una risposta immune nei confronti del self tale da provocare l'insorgenza di fenomeni autoimmuni. L'alterazione di questi meccanismi di controllo può essere modificata sia a causa di anomalie genetiche, sia soprattutto in seguito ad eventi che si verificano nel corso della vita in seguito al complesso gioco di interazioni tra sistema immunitario ed i numerosi agenti biologici che continuamente tale sistema è chiamato a combattere ed a neutralizzare al fine di salvaguardare l'omeostasi dell'organismo.

La sclerosi multipla è una malattia autoimmune, infiammatoria e demielinizzante che colpisce il sistema nervoso centrale (SNC). La demielinizzazione consiste nella scomparsa della mielina, sostanza costituita da acidi grassi che riveste gli assoni delle fibre nervose. Nel SNC, la mielina prodotta dagli oligodendrociti, è fondamentale nella trasmissione degli impulsi nervosi. Il manicotto isolante costituito dalla guaina mielinica, formato da strati concentrici di membrana plasmatica delle cellule gliali, si interrompe a intervalli regolari in corrispondenza dei nodi di Ranvier, strozzature in cui la membrana dell'assone può effettuare gli scambi ionici necessari per generare i potenziali d'azione. La conduzione elettrica nelle fibre mielinizzate è quindi saltatoria, cioè avviene da nodo a nodo, ed è estremamente più veloce rispetto a quella che si verifica lungo le cosiddette fibre amieliniche (assoni non mielinizzati). La sua distruzione causa il blocco o il rallentamento della normale conduzione degli impulsi nervosi comportando il manifestarsi di una estrema varietà di sintomi propri di questa malattia (figura.1). Le zone in cui la mielina è stata danneggiata o distrutta vengono anche dette "placche" e tali aree nel tempo vanno incontro ad un processo di cicatrizzazione. Da qui nasce il nome sclerosi multipla, "sclerosi" per la presenza di lesioni cicatrizzate (le placche), "multipla" per il fatto che le lesioni possono interessare varie zone del sistema nervoso centrale.

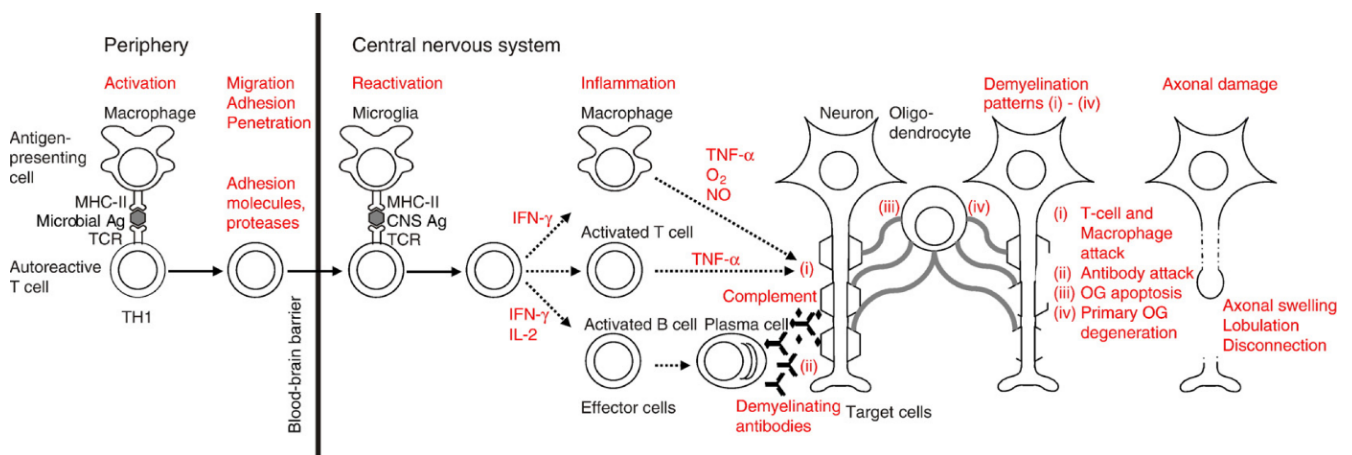
Dott.ssa Monia Lobina. *Ricerca delle varianti genetiche implicate nella regolazione dei livelli delle immunoglobuline e comprensione dei meccanismi biologici nell'eziopatogenesi delle patologie autoimmuni tra cui la Sclerosi Multipla.* Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche. Indirizzo in Genetica Medica, Malattie Metaboliche e Nutrigenomica. Università degli Studi di Sassari.

Figura 1: Alterazione dell'impulso nervoso in SM



Fisiopatologia. La SM è una patologia cronica, progressiva, che coinvolge il sistema immunitario. Questo disturbo autoimmune è causato da linfociti T autoreattivi nei confronti della mielina, che sono in grado di guidare un evento infiammatorio con coinvolgimento secondario dei macrofagi e conseguente distruzione della mielina. Lo schema sottostante (figura 2) propone un ipotetico meccanismo della SM:

Figura 2



Neuhaus O. et al. *J. Neurological Sciences* 2007

Le cellule T pro-infiammatorie vengono attivate nella periferia da antigeni estranei presentati dal MHC-II da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC). I linfociti T attraversano la barriera ematoencefalica (BEE) e una volta giunti nel SNC vengono riattivati prevalentemente dalle microglia, determinando la secrezione da parte delle stesse di citochine proinfiammatorie, di macrofagi, cellule T che attaccano la guaina mielinica, e cellule B che producono anticorpi demielinizzanti.

Dott.ssa Monia Lobina. *Ricerca delle varianti genetiche implicate nella regolazione dei livelli delle immunoglobuline e comprensione dei meccanismi biologici nell'eziopatogenesi delle patologie autoimmuni tra cui la Sclerosi Multipla.* Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche. Indirizzo in Genetica Medica, Malattie Metaboliche e Nutrigenomica. Università degli Studi di Sassari.

Attraverso i loro recettori (TCR), i linfociti pro-infiammatori sono attivati in periferia da antigeni presentati dal complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC II). Una volta attivati, i linfociti T migrano, aderiscono e penetrano la barriera ematoencefalica mediante meccanismi di adesione molecolare, proteasi e citochine. All'interno del sistema nervoso centrale, i linfociti T vengono riattivati dal MHC II espresso sulla superficie delle APC. I linfociti T riattivati secernono citochine pro-infiammatorie, come interferone (INF- γ) o interleuchine (IL-2) e inducono infiammazione nel sistema nervoso centrale con conseguente attivazione di molecole effettrici come macrofagi, linfociti B e altri linfociti T (Figura 7). I macrofagi e i Linfociti T attaccano la guaina mielinica attraverso mediatori citotossici, soprattutto tumor necrosis factor (TNF- α), le specie radicaliche dell'ossigeno (O₂) e l'ossido nitrico (NO). I Linfociti B presenti nel circolo ematico come plasmablasti e cellule B di memoria che sono stati aberrantemente attivati, penetrano nel SNC attraverso la BEE danneggiata e, si differenziano in plasmacellule che secernono anticorpi demielinizzanti. Questi ultimi possono attivare altri macrofagi o la cascata del complemento che causa il danno mielinico (McFarland H. *et al.*, Nature Immunology 2007). La turbativa della barriera ematoencefalica dura circa un mese e si risolve lasciando un'area danneggiata, il cui danno può essere visualizzato con una risonanza magnetica nucleare convenzionale (RMN). Questa evidenza la presenza di placche di demielinizzazione definite multifocali poiché compaiono in diverse aree del SNC e, anche se alcune placche regrediscono completamente, in generale il numero di lesioni aumenta nel tempo, rispettando così il criterio di disseminazione temporale e spaziale che rappresenta la caratteristica clinica peculiare della SM. L'episodio di esordio può essere monosintomatico, dovuto cioè all'interessamento di un solo sistema neurologico, o essere caratterizzato dall'associazione di segni e sintomi che indicano il contemporaneo coinvolgimento di più sistemi. I sintomi interessano le diverse funzioni dell'organismo regolate dal SNC, ovvero il movimento (facile affaticamento, paralisi di uno o più arti, disturbi della coordinazione), le sensibilità (sensazione di anestesia, formicolio), la vista (annebbiamento,

visione doppia), l'equilibrio, la parola, la coordinazione, le funzioni sfinteriche. Le manifestazioni della malattia variano a seconda delle aree dell'encefalo e del midollo spinale colpite. Attualmente è possibile riconoscere quattro diverse forme di SM: la recidivante-remittente, la secondariamente progressiva, la primariamente progressiva e la progressiva con ricadute.

La recidivante-remittente (SM-RR) è la forma clinica più frequente (circa l'85%) ed è caratterizzata da episodi acuti di malattia (definiti 'ricadute') alternati a periodi di benessere (definite 'remissioni'). Le recidive si verificano circa una volta all'anno e queste ricadute inducono la rapida insorgenza di difetti neurologici, differenti in base alle regioni, del cervello o del midollo spinale, coinvolte. Queste recidive sono di solito seguite da un certo recupero delle funzioni neurologiche perse, chiamata fase di remissione.

La SM secondariamente progressiva (SM-SP), si sviluppa come evoluzione della forma recidivante-remittente ed è caratterizzata da una disabilità persistente che progredisce gradualmente nel tempo. Circa il 30-50% delle persone con SM, che inizialmente hanno una forma recidivante-remittente, sviluppano entro 10 anni circa, una forma secondariamente progressiva.

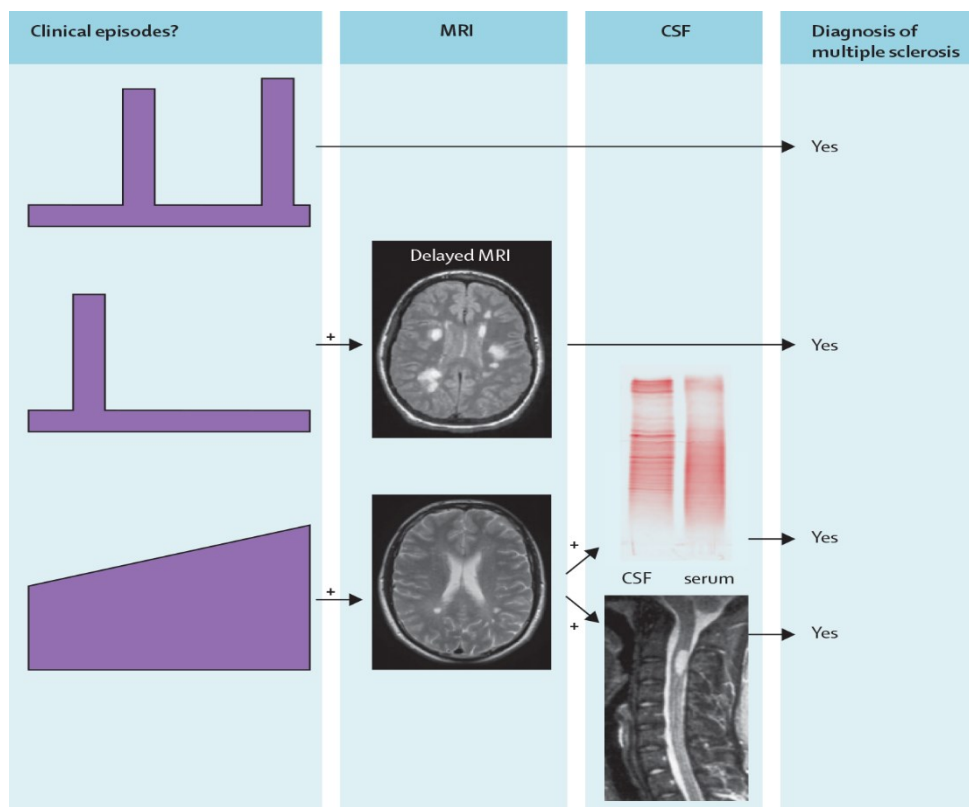
La SM primariamente progressiva (SM-PP), che colpisce circa il 10% degli affetti SM, è caratterizzata dall'assenza di vere e proprie ricadute; all'esordio i sintomi iniziano in modo graduale e tendono a progredire lentamente nel tempo.

La SM progressiva con ricadute (SM-PR) che rappresenta il 5% dei casi. Questa forma è caratterizzata da una disabilità progressiva già dal suo esordio e da uno scarso recupero dopo ogni episodio acuto di malattia.

La diagnosi della SM, di solito, è abbastanza agevole nei giovani adulti che presentano sintomi recidivanti e remittenti riferibili a diverse aree della sostanza bianca, mentre è ben più difficile

nei pazienti con esordio recente o che presentano un decorso primitivamente progressivo. L'iter diagnostico comunque, richiede innanzitutto un'accurata anamnesi, la quale deve essere volta ad individuare non solo le condizioni cliniche attuali del paziente, ma anche eventuali sintomi pregressi. Successivamente deve essere eseguito l'esame obiettivo neurologico del paziente, ricercando la presenza dei segni prima descritti. Di fondamentale importanza, infine, sono anche le indagini strumentali, come la RMN e l'esame del liquido cefalorachidiano (CSF), mentre lo studio neurofisiologico dell'encefalo e del midollo spinale con i potenziali evocati può aiutare a definire la diagnosi (figura 3)

Figura 3



Alastair C et al. Lancet 2008

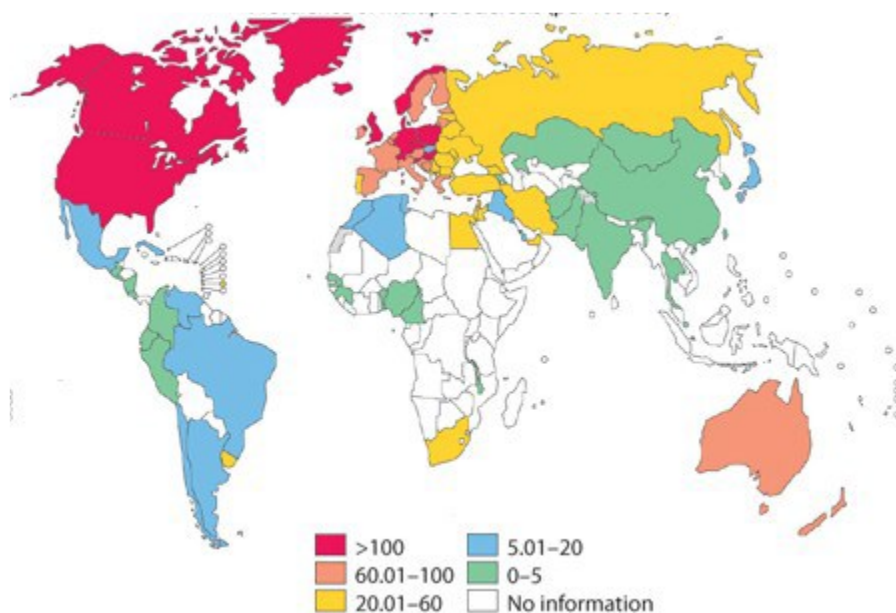
Criteria di McDonald modificati per la diagnosi di SM. Il principio è quello di stabilire la diffusione nel tempo e nel luogo delle lesioni, cioè stabilire che gli episodi che interessano diverse aree del sistema nervoso centrale si siano verificati almeno a 30 giorni di distanza gli uni dagli altri. Nel caso di un solo episodio clinico la RMN può essere utilizzata per la diagnosi e sostituire così la presenza o meno del secondo episodio. La sclerosi multipla primaria progressiva può essere diagnosticata dopo 1 anno di un deficit progressivo, due RMN positive (midollo spinale e sistema nervoso) e la presenza di bande oligoclonali.

Nel contesto di un ampio spettro di malattie demielinizzanti con quadro patologico simile, una diagnosi corretta e rapida dipende spesso dalla descrizione dei sintomi da parte del paziente e dall'esperienza del medico. Inoltre le tecniche di RMN, sempre più sofisticate e sensibili, sono ormai ampiamente utilizzate e coadiuvano il medico nella diagnosi secondo i criteri ormai universalmente riconosciuti e recentemente revisionati di McDonald (Polman C.H. *et al.*, Annual of Neurology 2011). Tuttavia ci sono ancora pazienti suggestivi di SM che non soddisfano i criteri di McDonald rivisti o risulta difficile una prognosi sulle immagini delle RMN. Qui si inseriscono i biomarcatori che sono in grado di supportare la conferma della diagnosi, il monitoraggio della progressione della malattia, l'efficienza della terapia, e le decisioni circa il miglior trattamento per il singolo paziente. Il CSF è la sorgente di biomarker per eccellenza nella SM. Si presenta come un liquido trasparente, incolore che contiene solo poche cellule in condizioni non patologiche. Esso circonda il midollo spinale e l'encefalo e il suo volume è di circa 140 ml nell'adulto. Svolge funzioni meccaniche, in quanto protegge il SNC da traumi dovuti a sollecitazioni continue legate al movimento e funzioni metaboliche poiché mantiene l'equilibrio elettrolitico del SNC, influenza il sistema acido base e trasporta in tutto il SNC ormoni, neurotrasmettitori e neuropeptidi. In altre parole, il liquor esercita a livello del nevrasso (encefalo e midollo spinale) un'azione analoga a quella esercitata dal sangue e dalla linfa negli altri organi. Il suo equilibrio chimico fisico è garantito dalla presenza della BEE che lo isola, insieme a tutto il SNC, dalla circolazione ematica. A differenza di altri fluidi corporei facilmente ottenibili, la raccolta del CSF è invasiva e di solito il campione è raccolto solo una volta da un dato paziente. Quindi è auspicabile ottenere quante più informazioni possibili da questi campioni (Fitzner B. *et al.*, Autoimmun reviews 2015). In SM vari tipi di cellule (neuroni, cellule gliali, cellule immunitarie e cellule endoteliali) contribuiscono in modi diversi alla fenotipo della malattia. Queste cellule sono potenziali fonti di biomarcatori che si diffondono nel liquor. Tipicamente nel CSF la componente cellulare è molto ridotta e corrisponde a circa 5 cellule leucocitarie per microlitro mentre nei pazienti affetti da SM si ha

un aumento dei leucociti che possano arrivare a 50 cellule per microlitro. Le cellule presenti nel CSF sono caratterizzate da un profilo di espressione di iper attivazione infatti si riscontra una elevata sintesi di IgG anticorpale intratecale con formazione di OCB, elevati livelli di citochine proinfiammatorie ed infine una accentuata espressione di molecole di adesione. La determinazione dei livelli liquorali e sierici di albumina consentono di determinare il rapporto “albumina CSF/siero” dell’albumina stessa che è considerato il più accurato indice di funzionalità della barriera emato-liquorale (Stangel M. *et al.*, Nat. Rev. Neurol.2013, Fitzner B. *et al.*, Autoimmun reviews 2015).

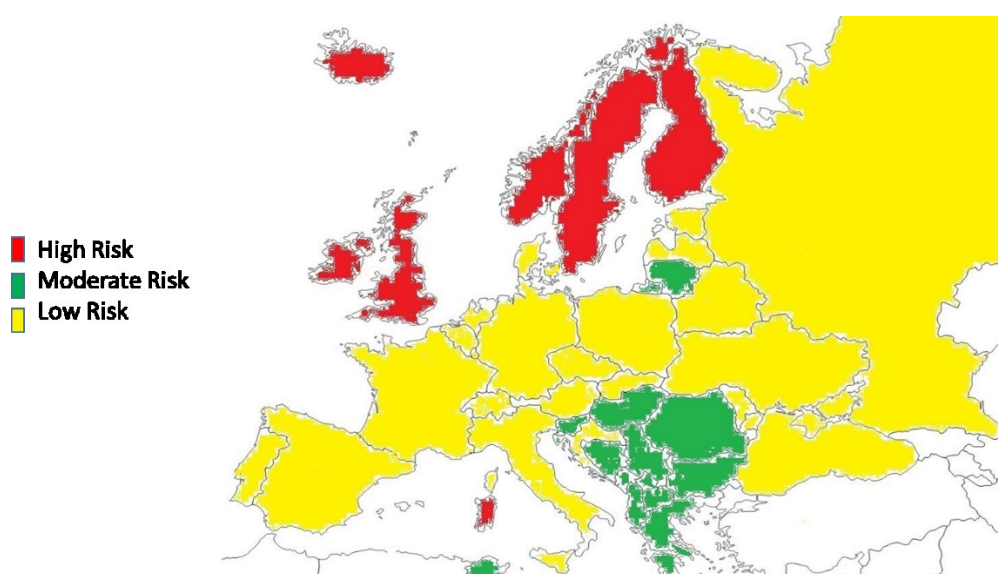
Epidemiologia. La SM ha un esordio variabile, tra i 15 e i 50 anni, anche se si manifesta soprattutto tra i giovani adulti, e prevalentemente nel sesso femminile, in rapporto di 3:1 nella forma clinica più frequente, la recidivante-remittente, che diventa 1:1 nella forma primariamente progressiva. L'OMS, stima che nel mondo ci siano oltre 2,5 milioni di persone affette. Negli Stati Uniti, la patologia colpisce circa 400.000 persone ed in Italia si stima ci siano circa 50.000 individui affetti (Pugliatti M. *et al.*, Eur J Neurol 2006). La conoscenza della distribuzione geografica della SM è molto importante e dimostra che prevalenza, incidenza e grado di mortalità variano in rapporto alla latitudine, aumentando in particolare con la distanza dall’equatore. La patologia è molto frequente tra le popolazioni caucasiche (soprattutto tra quelle residenti nel nord-ovest europeo), nel nord America, nel sud-est dell’Australia e in Nuova Zelanda, sud-Africa e America meridionale, mentre si riscontra una bassa incidenza in Asia e nelle regioni caraibiche. La figura 4 mostra, il differente range di prevalenza nei paesi di tutto il mondo.

Figura 4. Prevalenza della sclerosi multipla nel mondo (per 100,000)



In Europa l'incidenza sembra seguire un gradiente nord-sud, con una più alta prevalenza nei paesi del nord, soprattutto in Scandinavia, e bassa nei paesi del sud, ad eccezione della Sardegna che mostra una prevalenza due volte superiore rispetto al resto della popolazione italiana e alla maggior parte delle popolazioni caucasiche (240 casi per 100,000 abitanti) (Sardu C. *et al.*, PLoS One 2012) (figura5).

Figura 5. Prevalenza della sclerosi multipla in Europa (per 100,000)



Cartina adattata e aggiornata da Sardu C. *et al.* PLoS ONE 2012

Dott.ssa Monia Lobina. *Ricerca delle varianti genetiche implicate nella regolazione dei livelli delle immunoglobuline e comprensione dei meccanismi biologici nell'eziopatogenesi delle patologie autoimmuni tra cui la Sclerosi Multipla.* Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche. Indirizzo in Genetica Medica, Malattie Metaboliche e Nutrigenomica. Università degli Studi di Sassari.

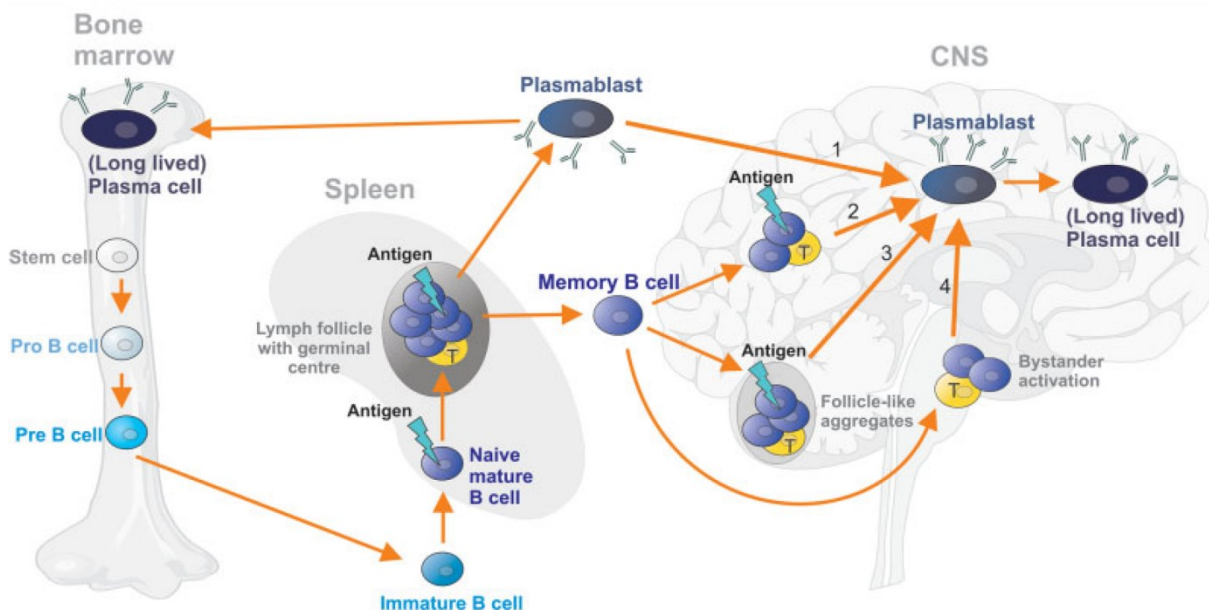
Questa diversa distribuzione geografica non può essere spiegata solo sulla base della genetica delle popolazioni; infatti, i tassi di prevalenza della popolazione bianca che vive al di fuori dell'Europa sono la metà di quelli rilevati in Europa e gli studi sui migranti forniscono la prova definitiva dell'importanza dei fattori ambientali sul rischio di insorgenza della malattia. Studi condotti sugli immigrati in Sud Africa, Israele, Hawaii e Gran Bretagna correlano il rischio di ammalarsi di SM con il luogo di residenza durante l'infanzia, e inoltre la migrazione da regioni ad alto rischio verso quelle a basso rischio durante l'infanzia riducono il rischio di contrarre la malattia (Alastair C. *et al.*, Lancet 2008). Allo stesso tempo numerosi studi effettuati sull'ereditarietà della patologia, condotti sui gemelli e sui fratelli di individui affetti, hanno messo in evidenza l'importanza del ruolo dei fattori genetici nella predisposizione alla malattia, dimostrando che il rischio d'ammalarsi di SM aumenta con l'aumentare delle relazioni parentali con la persona affetta ma, allo stesso tempo, evidenziando che i gemelli monozigoti sono concordanti per la malattia solo per circa il 30% (Alastair C. *et al.*, Lancet 2008) (Willer C.J. *et al.*, PNAS 2003). Pertanto, le evidenze epidemiologiche mostrano che la prevalenza e l'incidenza risentono di fattori eziologici, genetici e ambientali combinati tra loro in modo variabile. L'incidenza e la prevalenza appaiono in costante aumento, ma non è ancora chiaro se questa crescita sia da attribuirsi ad un effettivo aumento del rischio o, se a fianco a questo, un ruolo rilevante sia giocato da una diagnosi sempre più precoce, resa possibile da metodiche diagnostiche sempre più sensibili e accurate.

Genetica della SM. Le attuali conoscenze sulla SM sembrerebbero suggerire una eziologia multifattoriale: un individuo suscettibile allo sviluppo della malattia, per ragioni probabilmente connesse alla sua costituzione immunitaria, incontra a una età specifica e critica (infanzia o prima adolescenza) un fattore ambientale, probabilmente di natura infettiva; questa combinazione di situazioni ed eventi porta all'insorgenza della SM. Per oltre 30 anni l'unico locus genico di suscettibilità noto per SM, è stato il complesso maggiore di istocompatibilità

(MHC). Inoltre, la regione HLA (Human leukocyte antigen) dell'MHC rappresenta ad oggi il locus che esercita il maggiore effetto di rischio genetico della SM. In diversi gruppi etnici è stato costantemente associato ad un esteso aplotipo predisponente, DRB1*1501-DQB1*0602 (anche definito sierologicamente, aplotipo DR2, DQw1), mentre nella popolazione sarda, la SM è stata associata a diversi aplotipi dei loci DRB1 - DQB1; quali il DRB1*0301-DQB1*0201 e DRB1*0405-DQB1*0301 (Marrosu M.G. *et al.*, Human Molecular Genetics 1998). In particolare sono stati descritti cinque aplotipi DRB1- DQB1 associati positivamente con la SM; DRB1*1303-DQB1*0301, DRB1*0405-DQB1*0301, DRB1*0301-DQB1*0201, DRB1*1501-DQB1*0602, DRB1*0405-DQB1*0302 e nessun aplotipo negativamente associato alla malattia in maniera significativa (Marrosu M.G. *et al.*, Human Molecular Genetics 1998). Il sequenziamento di tutto il genoma umano, la sua successiva caratterizzazione, lo sviluppo di tecnologie innovative per la genotipizzazione su larga scala e di nuovi potenti metodi statistici, ci permettono oggi di affrontare lo studio di queste patologie con nuovi strumenti che incrementano notevolmente le potenzialità di indagine degli studi genetici in quanto consentono di rilevare geni di suscettibilità con effetti modesti in malattie genetiche complesse come la SM. In questo contesto nel 2007 l'International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) ha completato il primo studio di GWAS su SM e sono giunti all'identificazione di un nuovo locus di suscettibilità *IL2RA* e, contemporaneamente ad altri due gruppi di ricerca, hanno confermando un altro locus di suscettibilità, *IL7R* (Gregory S.G. *et al.*, Nature Genetics 2007; Lundmark F. *et al.*, Nature Genetics 2007). Da allora il progresso è stato rapido e la lista dei loci di suscettibilità per SM diversi dal HLA è cresciuta notevolmente. Recentemente, l'International Multiple Sclerosis Genetics Consortium ha identificato ulteriori 48 varianti di suscettibilità per la SM (IMSGC Nature Genetics 2013) che uniti a quelli già identificati conducono alla catalogazione di 110 varianti di rischio su 103 loci al di fuori della regione HLA. Questi alleli di rischio hanno effetti individuali modesti e apparentemente agiscono in modo indipendente.

Cellule B e anticorpi. Nel corso degli ultimi anni numerose evidenze scientifiche hanno dimostrato il coinvolgimento delle cellule B e delle immunoglobuline nelle malattie autoimmuni. In particolare, un recente studio di fine-mapping ha cercato di riassumere i risultati ottenuti dalla comunità scientifica su questo tema analizzando i dati provenienti dalla mappatura genetica di 21 malattie autoimmuni, integrati con i dati provenienti da studi epigenetici derivanti dalla mappatura del RNA e della cromatina di diverse cellule immunitarie, tra cui le sottoclassi di cellule TCD4⁺, cellule TCD8⁺, cellule T regolatorie, cellule B e monociti. Attraverso la creazione di un algoritmo, Probabilistic Identification of Causal SNPs (PICS), si è riusciti a stimare il forte coinvolgimento delle cellule B in alcune malattie autoimmuni e nella sclerosi multipla in particolare (Kyle K. F. *et al*, Nature 2015). La presenza di bande oligoclonali (OGB) nel CSF di pazienti affetti da SM è universalmente accettata come un importante strumento immunodiagnostico per la diagnosi della malattia anche se, il 5-10% delle persone affette presenta concentrazioni umorali nel range di normalità e le OGB si possono riscontrare anche in altre malattie autoimmunitarie, infettive e cerebrovascolari. Questo significa che l'esame del liquor di per sé non permette né di confermare né di escludere una diagnosi di SM, ma è importante se valutato insieme al quadro clinico e ai risultati delle altre valutazioni diagnostiche strumentali. La presenza di queste bande indica una produzione intratecale di immunoglobuline, e il CNS dei pazienti con SM fornisce un ambiente ideale per la produzione delle stesse grazie al processo infiammatorio in corso che ne stimola la produzione così come all'elevata presenza di fattori di sopravvivenze delle cellule B come BAFF (Krumbhlotz M.*et al.*, Neurology 2012).

Figura 6. Quattro possibili percorsi di produzione delle immunoglobuline nel SNC



Meinl E. et al: *Ann Neurol* 2006 Lo sviluppo delle cellule B inizia nel midollo osseo e prosegue negli organi linfatici secondari (per esempio, milza), dove le cellule B naïve mature si differenziano, nel centro germinale, in plasmablasti e cellule B di memoria. Da qui vengono riversate nel circolo ematico. I plasmablasti dal sangue possono entrare nel midollo osseo, ma anche nel SNC infiammato (Track1). Le cellule B di memoria possono penetrare nel SNC e differenziarsi in cellule che secernono plasmablasti attraverso tre diverse vie. (Track2-3-4) Quei plasmablasti che trovano adeguate condizioni di sopravvivenza si sviluppano in plasmacellule lunga emivita che causano bande oligoclonali.

I primi stadi di maturazione delle cellule B da cellule staminali ematopoietiche in cellule pro-B e cellule pre-B si verificano nel midollo osseo. Da questo organo linfoide primario, le cellule B immature naïve ($IgM^+ IgD^-$) migrano agli organi linfatici secondari quali la milza e si sviluppano in cellule B naïve mature ($IgM^{low} IgD^{high}$). Quando le cellule B naïve incontrano gli antigeni migrano in profondità nel follicolo e iniziano a proliferare intensamente dando origine al centro germinativo (GC). Alcune di queste cellule B attivate si sviluppano al di fuori dei follicoli linfatici per diventare plasmablasti di breve durata, altre si differenziano in cellule B di memoria. Alcuni linfociti B di memoria restano negli organi linfoidi mentre altri abbandonano i centri germinativi e ricircolano nel sangue tra milza e linfonodi. Come indicato in figura 6, i plasmablasti possono entrare direttamente nel SNC superando la BEE resa permeabile a seguito di uno stato infiammatorio dello stesso (percorso 1). Alcune cellule di B di memoria che sono riuscite a penetrare nel SNC possono differenziarsi in cellule secernenti anticorpi in risposta ad antigeni follicolari esterni (percorso 2) o in risposta ad aggregati

follicolari meingiali (percorso 3). Infine le cellule B di memoria sono in grado di differenziarsi in plasmablasti indipendentemente dall'incontro con l'antigene (percorso 4) in un processo chiamato bystander reaction. Questi plasmablasti trovano condizioni di sopravvivenza favorevoli e producono plasmacellule longeve che danno origine alle bande oligoclonali (Meiln E. *et al.*, B cell in the CNS Ann Neurol 2006). Un ruolo cruciale per la sopravvivenza delle cellule B e delle cellule secernenti anticorpi (ASCs) è svolto dalla proteina BAFF. Un eccesso di questa proteina porta ad uno sviluppo di disordini autoimmuni in modelli animali e alti livelli della stessa sono stati misurati nel siero di individui affetti da diverse patologie autoimmuni. BAFF è una proteina transmembrana di tipo II appartenente alla Superfamiglia dei Tumor Necrosis Factor Ligand ed è codificata dal gene *TNFSF13B*. Può essere anche rilasciata in una forma solubile, biologicamente attiva, mediante il clivaggio proteolitico della porzione ammino-terminale del dominio di omologia del TNF ad opera di una convertasi simile alla furina. BAFF è prodotto in seguito a stimolazione da parte dell'interferon- γ e IL-10, da macrofagi, monociti, cellule dendritiche, e dalle cellule B (Mackay F. *et al.*, Nat. Rev. Immunol. 2009). È un potente attivatore della proliferazione, differenziamento e sopravvivenza delle cellule B. attraverso il legame con tre recettori BCMA (B-cell maturation antigen), TACI (transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand (CALM) interaction) e BAFF-R (BAFF receptor; BR3) suo recettore esclusivo.

A supporto dell'ipotesi del coinvolgimento delle cellule B nella SM sono state progettate e sono tuttora in fase di sviluppo clinico diverse terapie che agiscono sull'immunologia delle cellule B (figura 7). Infatti, attualmente esistono diversi farmaci che agiscono attraverso la deplezione delle cellule B mediata da anticorpi anti CD-20, il marcatore di superficie espresso sulle cellule B, presente in tutte le fasi di maturazione ma sottoregolato durante il differenziamento delle plasmacellule. In particolare l'anticorpo monoclonale chimerico, geneticamente ingegnerizzato, composto da porzioni variabili murine e porzioni costanti umane

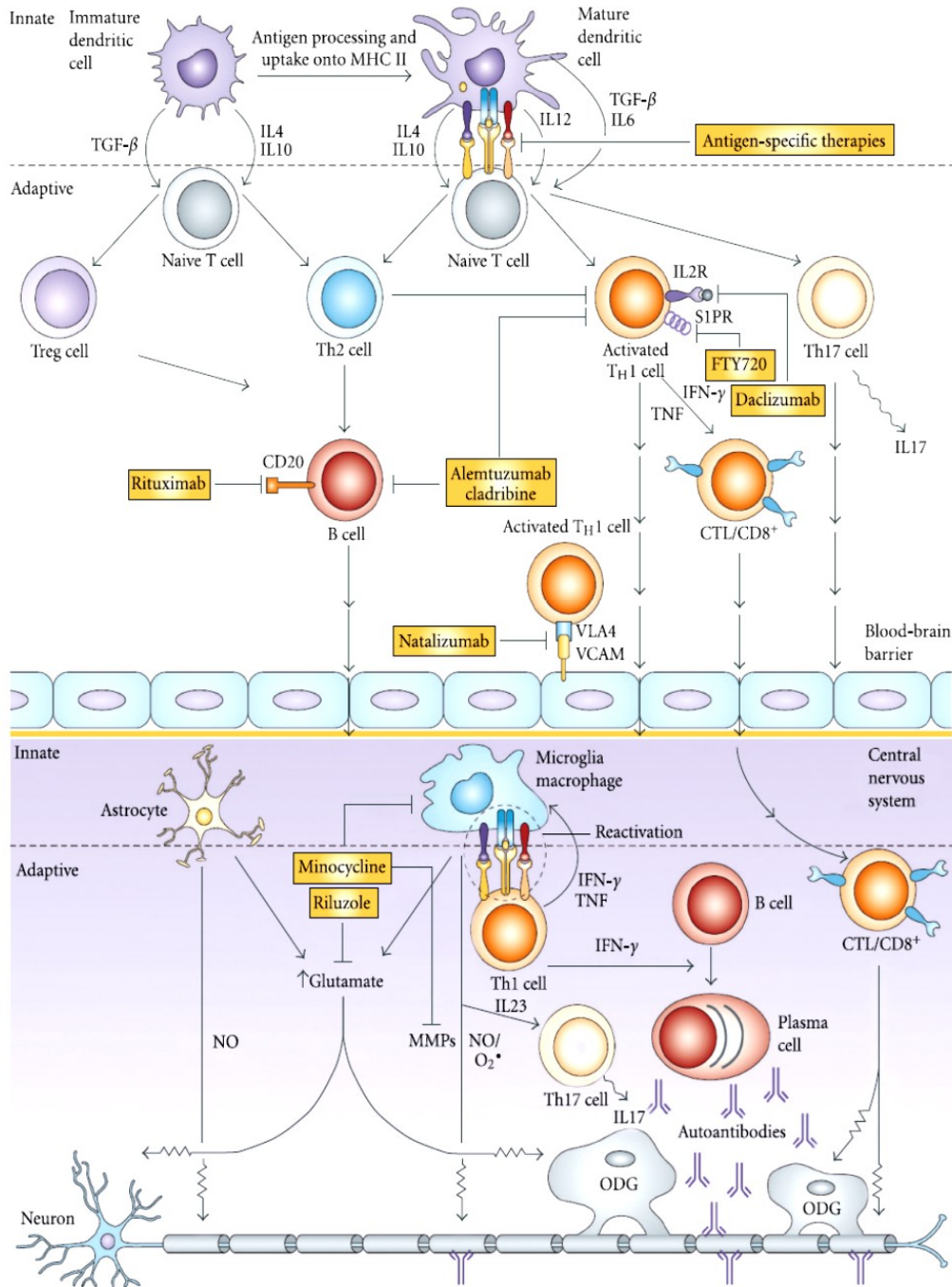
(commercialmente noto come Rituximab). L'anticorpo monoclonale (presente sul mercato farmaceutico con il nome Ofatumumab) ottenuto grazie all'uso topi transgenici esprimenti le regioni costanti e variabili delle Ig umane. Ed infine l'anticorpo monoclonale umanizzato, costruito con regioni ipervariabili murine e il resto della struttura dell'anticorpo è di derivazione umana (commercializzato come l'Ocrelizumab) (Pröbstel A.K. *et al.*, Int. J. Mol. Sci. 2015). Tutti questi farmaci agiscono attraverso l'impoverimento delle cellule B CD20⁺ nel sangue, liquor e tessuti. Un altro approccio in studi clinici, sempre contro le cellule B, impiega l'anticorpo monoclonale umanizzato MED-551 diretto contro CD19, un antigene di membrana che è ampiamente espresso durante lo sviluppo delle cellule B, dallo stadio di pre-B a quello precoce di plasmacellula (Krumbholtz M. *et al.*, Neurology 2012). Un altro farmaco commercialmente noto come Alemtuzumab e costituito da un anticorpo monoclonale umano il cui target è il CD52 antigene espresso sia sui linfociti B che sui Linfociti T. In corso di sperimentazione clinica vengono utilizzati anche anticorpi che esercitano la loro azione nei confronti di molecole che guidano la migrazione dei linfociti verso i siti della flogosi. Uno di questi è l'anticorpo monoclonale umanizzato anti integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) (conosciuto commercialmente come Natalizumab), che inibisce l'egresso dei linfociti T, B e monociti dal letto vascolare e limitando il raggiungimento del CNS. Tuttavia durante il trial clinico, un certo numero di pazienti, ha sviluppato la leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML), una patologia demielinizzante potenzialmente letale che si manifesta quasi esclusivamente in pazienti immunodepressi (ad esempio pazienti affetti da AIDS o in terapia con farmaci immunosoppressori) ed è dovuta al John Cunningham virus (JCV). È stato successivamente riammesso come farmaco per MS ma solo per quei pazienti che non presentano fattori di rischio specifici per la PML (Chen S. *et al.*, Clinical and Developmental Immunology 2012) (Pröbstel A.K. *et al.*, Int. J. Mol. Sci. 2015). Un'ulteriore molecola biologicamente attiva è rappresentata dal'FTY720 (noto commercialmente come Fingolimod), che agisce sequestrando i linfociti dei linfonodi secondari, impedendo loro di migrare nel sistema nervoso centrale, grazie alla sua

attività modulatrice su uno dei cinque recettori della sfingosina-1-fosfato: l'S1PR1. Infine, l'anticorpo monoclonale umanizzato attivo sulla sub-unita alfa del recettore per l'IL-2 nelle cellule T (CD25, conosciuto come Daclizumab), rappresenta un farmaco che sta dimostrando la sua validità terapeutica e si trova in fase III e ancora la Minocycline, un antibiotico semisintetico orale, che ha la capacità di superare la barriera ematoencefalica e ha effetti neuroprotettivi, anche in malattie demielinizzanti come la SM. (Chen S. *et al.*, *Clinical and Developmental Immunology* 2012).

Ed infine una altra strategia di intervento contro la SM è attuata attraverso la terapia soppressoria verso BAFF che in alcuni casi coinvolge anche APRIL (a proliferation-inducing ligand), un'altra proteina coinvolta nella stimolazione delle cellule B, che compete, con BAFF per il legame con due recettori: BCMA e TACI.

Si tratta del LY2127399, il cui nome commerciale è Tavalumab, un anticorpo monoclonale umanizzato anti-BAFF, sia nella sua forma solubile che di membrana, per il quale è terminata la fase II della sperimentazione clinica in SM ma ancora non sono noti i risultati; l'anticorpo monoclonale anti-BAFFR, VAY736, in fase II della sperimentazione per SM-RR, e la proteina ricombinante totalmente di derivazione umana anti-TACI che agisce attraverso il blocco di BAFF e APRIL inibendo la maturazione delle cellule B commercializzata con il nome di Atacicept. Tuttavia, la sua sperimentazione è stata sospesa perché in alcuni pazienti SM si è verificato un esacerbarsi della malattia anziché un miglioramento, sono in corso ulteriori studi per conoscere il motivi di tale risultato (Pröbstel A.K. *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.* 2015).

Figura 7. Immunopatogenesi della SM e bersagli terapeutici



Chen S. et al. Clinical and Developmental Immunology 2012

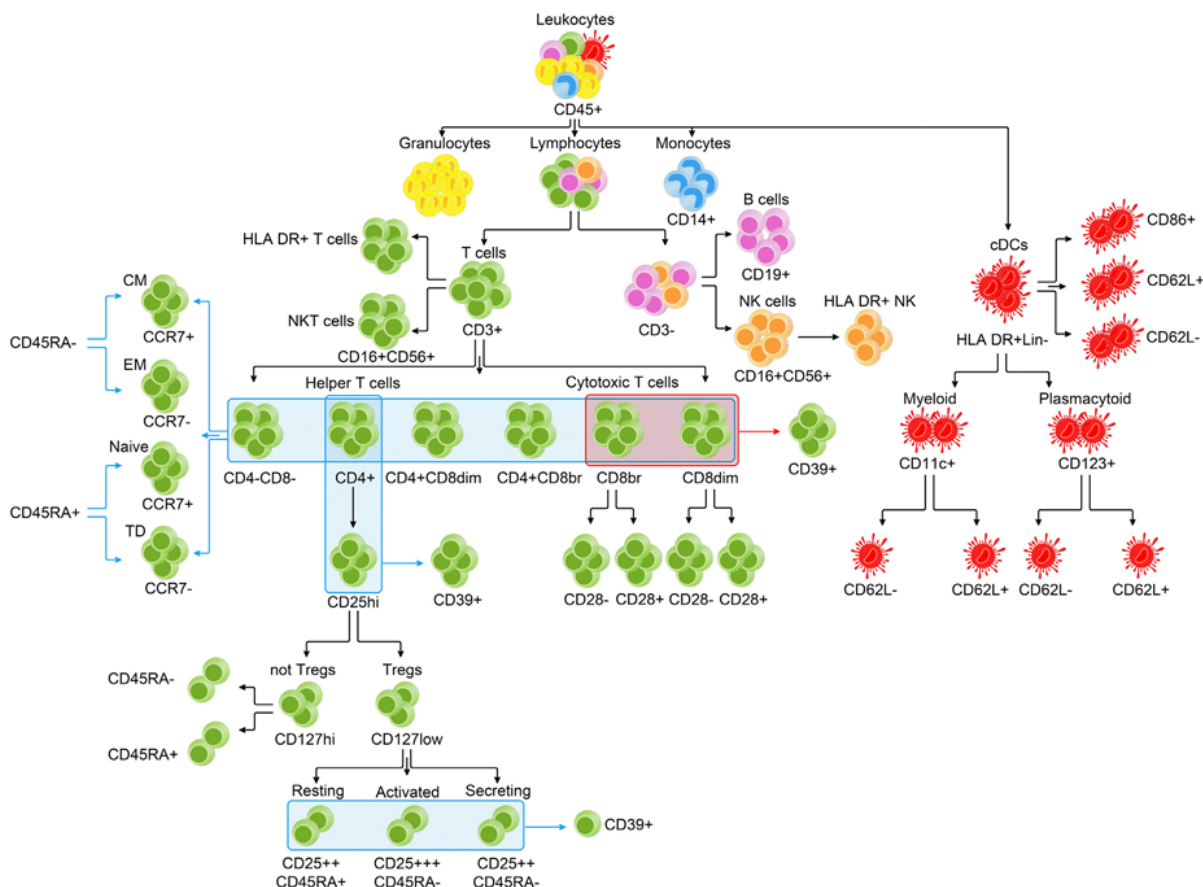
Un'aberrante attivazione delle cellule DCs mature può essere osservata nei pazienti con SM. Questo conduce ad un aumento dei livelli di citochine proinfiammatorie che inducono l'attivazione di linfociti Th1, Th17, cellule CD8+ e cellule B le quali a loro volta riescono a superare la BEE ed entrare nel SNC. La presenza di queste cellule unita ad un'attivazione anomala degli astrociti e microglia porta alla aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno, eccitotossicità, la produzione di autoanticorpi e citotossicità diretta, che sono tutti implicati nella demielinizzazione e assonale e danno neuronale che è presente nei pazienti con SM

Dott.ssa Monia Lobina. Ricerca delle varianti genetiche implicate nella regolazione dei livelli delle immunoglobuline e comprensione dei meccanismi biologici nell'eziopatogenesi delle patologie autoimmuni tra cui la Sclerosi Multipla. Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche. Indirizzo in Genetica Medica, Malattie Metaboliche e Nutrigenomica. Università degli Studi di Sassari.

MATERIALI E METODI

Tramite la citometria a flusso abbiamo caratterizzato una vasta gamma di sottotipi di cellule circolanti in un campione di 4000 individui, inclusi 300 volontari con più di 90 anni appartenenti alla coorte ProgeNIA. Abbiamo analizzato le popolazioni più numerose e importanti di leucociti, compresi i monociti, granulociti, cellule dendritiche circolanti (cDC), natural killer (NK), cellule B e cellule T (figura 8). Vista la loro rilevanza funzionale e il loro potenziale coinvolgimento in molte malattie autoimmuni e infiammatorie, ci siamo concentrati sulle cellule T suddivisi in base alla loro maturazione e al loro stato di attivazione, compresi i sottoinsiemi di cellule T regolatorie (Tregs) per un totale di circa 100 tipi di cellule considerate in conta assoluta e, se consideriamo anche le proporzioni con le cellule progenitrici il totale dei tratti studiati corrisponde a 272 (95 Conte Assolute, 94 % parentale e 80 % granparentali e 3 rapporti tra sottogruppi cellulari), che derivano dalla stima delle conte cellulari assolute espresse in numero di cellule per microlitro e dalla percentuali nei confronti delle linee cellulari gerarchicamente superiori sia di una generazione (popolazione parentale) che di due generazioni (popolazione granparentale). Questa strategia ci ha permesso di ottenere misure più robuste dei livelli delle popolazioni cellulari, riducendo la variabilità nelle misurazioni legate al campione o fluttuazioni dovute a fattori ambientali transitori che influenzano la totale conta dei leucociti.

Fig.8 Sottopopolazioni leucocitarie oggetto di studio



Orrù V. et al., Cell 2013

Diagramma dei tipi cellulari esaminati mediante citometria a flusso. Le frecce indicano i livelli gerarchici di separazione delle popolazioni cellulari leucocitarie circolanti. Le cellule presenti all'interno del rettangolo blu chiaro sono fenotipicamente caratterizzate dall'antigene indicato dalla freccia blu chiaro presente a fianco e rappresentano 6 sottogruppi delle cellule CD3⁺. Il rettangolo rosso indica che, le popolazioni cellulari incluse al suo interno, sono state analizzate insieme per l'antigene CD39, il marcatore indicato dalla freccia rossa.

In parallelo abbiamo proceduto alla valutazione nel siero dei volontari della coorte ProgeNIA di diverse molecole solubili di interesse immunologico tra cui le immunoglobuline IgA, IgM, IgG e le sue sottoclassi: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 mediante la tecnologia “bead-based” xMAP (Luminex) e la citochina sBAFF su 3000 volontari ProgeNIA tramite Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, E.L.I.S.A.

Infine, abbiamo integrato questi dati con le conte dei monociti effettuate su tutta la coorte ProgeNIA (~6000) effettuate tramite il conta globuli (Sistema Ematologico Coulter® LH700)

Dott.ssa Monia Lobina. *Ricerca delle varianti genetiche implicate nella regolazione dei livelli delle immunoglobuline e comprensione dei meccanismi biologici nell'eziopatogenesi delle patologie autoimmuni tra cui la Sclerosi Multipla.* Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche. Indirizzo in Genetica Medica, Malattie Metaboliche e Nutrigenomica. Università degli Studi di Sassari.

Misurazioni cellulari

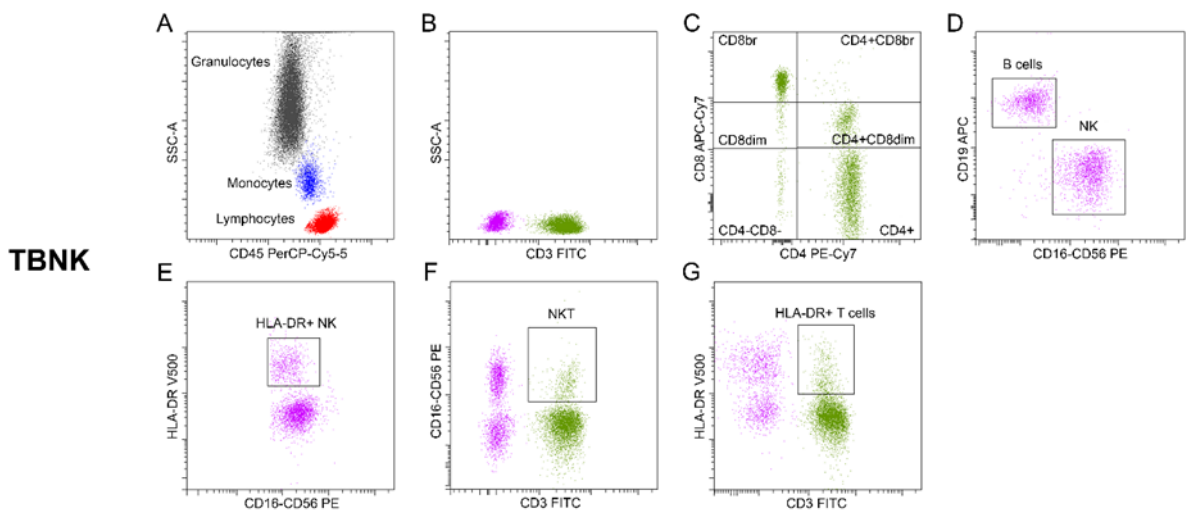
L'Immunofenotipizzazione è stata effettuata mediante citometria a flusso (FACS Canto II, BD Biosciences) su campioni di sangue periferico, raccolti in provette contenenti eparina come anticoagulante, e analizzati al citofluorimetro entro 2 ore dal prelievo per evitare artefatti dipendenti dal tempo. L'analisi immunofenotipica delle cellule bianche del sangue periferico di ciascun volontario è stata effettuata grazie all'utilizzo di quattro differenti pannelli di anticorpi monoclonali. Ogni pannello è costituito dall'insieme di anticorpi diretti verso gli antigeni di superficie che caratterizzano le popolazioni leucocitarie selezionate per lo studio, e sono stati denominati in modo da indicare in sintesi i tipi cellulari o le caratteristiche principali delle cellule analizzate: pannello T-B-NK, pannello T regolatorie, pannello maturazione T cellulare e pannello cellule dendritiche circolanti. I dati citometrici trattati nella presente tesi sono stati ottenuti mediante il pannello TBNK che verrà trattato in dettaglio.

Il pannello **T-B-NK** permette di misurare 10 parametri con 9 anticorpi (tabella 1). Il protocollo utilizzato è denominato "Lyse-No-Wash" e prevede l'aggiunta di 50 µl di sangue fresco in tubi BD TruCount™ al cui interno sono presenti le biglie necessarie per calcolare la conta assoluta espressa come numero di cellule per µl. In seguito, i campioni di sangue sono stati colorati con gli anticorpi fluorescenti. Dopo 15 minuti dalla colorazione i campioni sono stati sottoposti a lisi cellulare per 30 minuti con 1 ml di FACS Lysing Solution 1X e, dopo un'incubazione di 3 ore a +4°C, sono stati acquisiti al citometro a flusso. Lo schema di analisi (figura 8) è il seguente: i leucociti vengono dapprima suddivisi in base alla positività all'antigene di superficie CD45 e a parametri morfologici in granulociti, monociti e linfociti. I linfociti sono stati differenziati in base all'espressione dell'antigene di superficie CD3. Le cellule CD3+, o linfociti T, sono state ulteriormente suddivise in 6 sottoclassi in base al grado di espressione degli antigeni CD4 e CD8 (CD4-CD8-, CD4- CD8dim, CD4- CD8 bright, CD4+ CD8+ e CD4+ CD8dim, CD4+ CD8-), mentre le cellule CD3- sono state suddivise in cellule B (CD3- CD19+)

Dott.ssa Monia Lobina. *Ricerca delle varianti genetiche implicate nella regolazione dei livelli delle immunoglobuline e comprensione dei meccanismi biologici nell'eziopatogenesi delle patologie autoimmuni tra cui la Sclerosi Multipla*. Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche. Indirizzo in Genetica Medica, Malattie Metaboliche e Nutrigenomica. Università degli Studi di Sassari.

e cellule natural killer (CD3- CD16+ e/o CD3- CD56+). Per rilevare il grado di attivazione cellulare dei linfociti T e delle cellule NK, è stato utilizzato l'anticorpo diretto contro l'antigene HLA-DR, il quale è costitutivamente espresso nelle cellule che presentano l'antigene quali le cellule B e le cellule dendritiche.

Figura 8. Gerarchia delle popolazioni cellulari T-B-NK



Separazione dei Leucociti in base alla morfologia e alla positività all'antigene CD45(A). Distinzione dei Linfociti in base alla positività al marcatore CD3(B) e successiva distinzione in 6 sottoclassi in base al grado di espressione dei marcatori CD4 e CD8 (C). I CD3 negativi vengono ulteriormente suddivisi cellule B e cellule Natural Killer (D).

Tabella 1

Pannello	Anticorpo	Fluorocromo	Clone
T-B-NK	anti-CD45	PerCP-Cy5.5	2D1 (HLA-1)
	anti-CD14	V450	MφP9
	anti-CD3	FITC	SK7
	anti-CD4	PE-Cy7	SK3
	anti-CD8	APC-Cy7	SK1
	anti-CD19	APC	SJ25C1
	anti-CD16+CD56	PE	B73.1+NCAM16.2
	anti-HLA DR	V500	G46-6

I monociti sono stati determinati su 6500 volontari ProgeNIA con l'utilizzo del Sistema Ematologico Coulter® LH700, analizzatore ematologico automatico per uso diagnostico "in vitro". Lo strumento impiega un sistema di valutazione non ottico, in grado di contare più di 6000 singole cellule al secondo con un livello di conteggio di 15 secondi. Una sospensione di

Dott.ssa Monia Lobina. *Ricerca delle varianti genetiche implicate nella regolazione dei livelli delle immunoglobuline e comprensione dei meccanismi biologici nell'eziopatogenesi delle patologie autoimmuni tra cui la Sclerosi Multipla.* Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche. Indirizzo in Genetica Medica, Malattie Metaboliche e Nutrigenomica. Università degli Studi di Sassari.

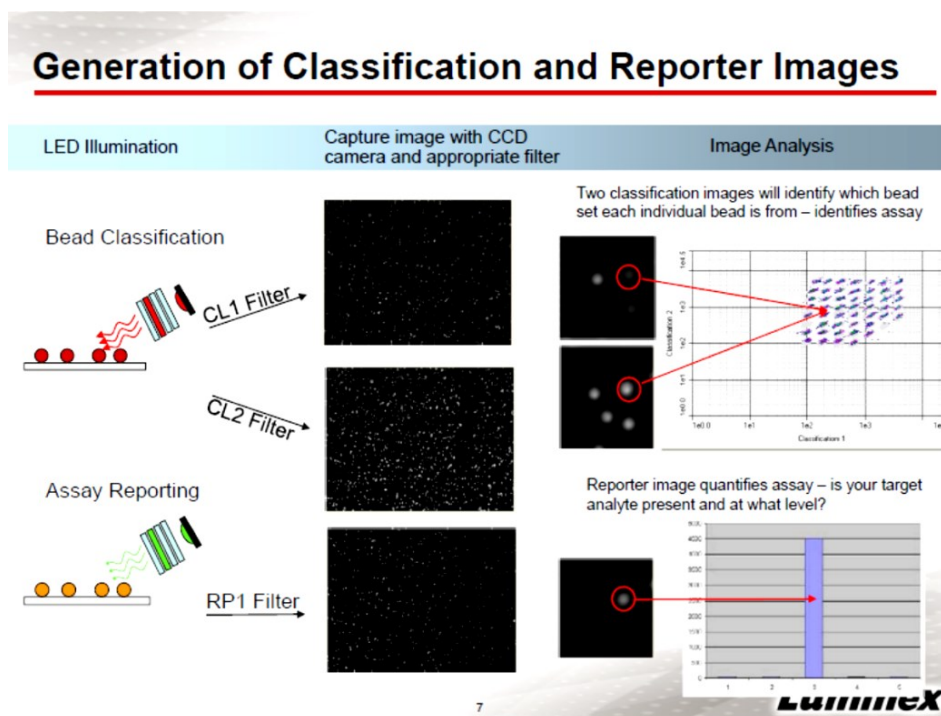
cellule ematiche è convogliata verso un foro che quando attraversato provoca una variazione nell'impedenza elettrica presente che è direttamente proporzionale alle dimensioni della cellula stessa. Il sistema conta le cellule individualmente e fornisce le distribuzioni dimensionali degli elementi.

Dosaggio delle molecole solubili

Immunoglobuline. Abbiamo effettuato il dosaggio delle Immunoglobuline totali IgA, IgM, IgG come somma delle sottoclassi IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ sul siero di circa 3000 volontari ProgeNIA, mediante la tecnologia “bead-based” xMAP (Luminex). Questa tecnologia permette la simultanea determinazione di più analiti in un unico assay attraverso l'uso di biglie magnetiche da 6,5 µm, colorate da due molecole fluorescenti che quando eccitate emettono nel rosso e nell'infrarosso e che sono presenti in diverso rapporto tra loro sulla superficie delle particelle magnetiche (10 diverse concentrazioni della molecola fluorescente che emette nel rosso e di quella che emette nell'infrarosso vengono utilizzate per generare 100 differenti regioni che identificano i diversi cluster di biglie). Ogni biglia con una determinata miscela dei due fluorofori è coniugata con un anticorpo specifico per un determinato analita oggetto delle quantificazione di interesse. Le microsfele vengono convogliate dentro una camera di rilevamento e disposte in un unico strato. Qui vengono colpite da un laser rosso o LED che eccita le molecole fluorescenti delle biglie emettendo luce “fluorescente”. Questa passa attraverso il dispositivo ad accoppiamento di carica CCD (Charge-coupled device) che trasforma i fotoni in immagini, intersecando in un plot l'immagine derivante dall'intensità di fluorescenza del colorante rosso (Classification 1) e l'immagine derivante dell'intensità di fluorescenza del colorante infrarosso (Classification 2), questo permette di identificare il particolare spettro o regione per ogni set di microsfele. Successivamente un laser verde o LED, eccita il colorante fluorescente sulla molecola reporter (Streptavidina-PE) la cui intensità di

fluorescenza è direttamente proporzionale alla concentrazione della molecola di interesse (Figura 9). I risultati quantitativi forniti dai saggi vengono interpretati dal software Bio-Plex Manager 6.1. Questo programma consente l'analisi completa dei dati, indicando per ogni pozzetto la deviazione standard, il coefficiente di variazione, il valore di recovery sugli standard e sui controlli positivi, il numero totale di microsfere lette, il numero di microsfere singole correttamente riconosciute e la percentuale di aggregati presenti. In dettaglio: 50µl di siero, diluiti 1:40.000 in isotyping diluent sono stati aggiunti alla piastra E.L.I.S.A., alla quale precedentemente sono stati aggiunti 50µl di una miscela composta da biglie magnetiche e Assay Diluent, e incubate a temperatura ambiente in agitazione a 850 rpm. Successivamente vengono aggiunti 25µl di Detection e, dopo un periodo di incubazione di 1 ora, vengono aggiunti 50µl di Streptavidina-PE. Dopo un periodo di incubazione di 20 minuti. La piastra è lavata con Wash Buffer le biglie vengono risospese in 125µl di Assay Buffer, quindi si procede con l'acquisizione dei dati tramite lo strumento Bio-Plex reader 200.

Figura 9



Generazione delle Immagini per identificare la regione caratteristica di ogni set di biglie ed elaborazione della fluorescenza della molecola reporter per quantificare la molecola di interesse

B cell activating factor (sBAFF). Abbiamo misurato il sBAFF sul siero di 2827 volontari ProgeNIA tramite l'Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, E.L.I.S.A della R&D System. Alla piastra, già coattata con un anticorpo di cattura specifico per l'analita di interesse, in questo caso un anticorpo monoclonale per BAFF/BLys, sono stati aggiunti 50 µl di siero e 50 µl di standard nei rispettivi pozzetti della piastra e successivamente incubata per 3 ore a TA. Dopo aver lavato via analita non legato, sono stati aggiunti in ogni pozzetto 200µl un anticorpo policlonale legato all'enzima e che funge da reporter seguito da un incubazione di 1 ora a TA. A seguito di un lavaggio per rimuovere l'anticorpo di rilevamento non legato, si aggiungono 200 µl di substrate solution e incubato a TA per 30 minuti. L'intensità del colore che si sviluppa è proporzionale alla quantità di anticorpo BAFF/BLys aggiunto inizialmente. La reazione è terminata con l'aggiunta di 50 µl di stop solution. La densità ottica di ciascun pozzetto è stata determinata tramite il lettore di piastra SPECTRAMax 384 PLUS alla lunghezza d'onda di 450nm e sottratta all'interferenza ottica della piastra ottenuta leggendo la stessa alla lunghezza d'onda di 570 nm.

Stima dell'ereditabilità

È stata eseguita la stima dell'ereditabilità (h^2 , Narrow eritability), utilizzando il metodo delle "componenti della varianza" per tutti i tratti oggetto dello studio per verificare quanto della variabilità fenotipica osservata sia geneticamente programmata. La stima è stata eseguita attraverso la valutazione dei tratti in esame sulle famiglie multigenerazionali (o verticali) costituita da genitori-figli, gemelli omozigoti, gemelli dizigoti, fratelli, fratellastri e cugini tutti presenti nella coorte ProgeNIA, utilizzando il software "poly" (Pilia G. *et al.*, PLoS Genet 2006) e adoperando l'età ed il genere come covariate, cioè come variabili che possono essere utili per spiegare la variabilità dei dati ottenuti. Abbiamo utilizzato un modello base in cui la varianza è stata suddivisa in componenti poligeniche e componenti ambientali. La componente ambientale è unica per ogni individuo, mentre la componente poligenica è condivisa tra gli individui in proporzione al loro grado di parentela. Una volta creato, il modello base è stato perfezionato

Dott.ssa Monia Lobina. *Ricerca delle varianti genetiche implicate nella regolazione dei livelli delle immunoglobuline e comprensione dei meccanismi biologici nell'eziopatogenesi delle patologie autoimmuni tra cui la Sclerosi Multipla*. Tesi di Dottorato in Scienze Biomediche. Indirizzo in Genetica Medica, Malattie Metaboliche e Nutrigenomica. Università degli Studi di Sassari.

suddividendo la componente genetica in due parti; la componente genetica additiva e quella dominante. La dominanza genetica, viene definita per indicare la probabilità che due individui appartenenti alle classi sopraindicate condividano due alleli identici per discendenza (IBD), sulla base della loro parentela documentata (questa quantità è stata calcolata utilizzando i coefficienti di parentela generalizzati (Lange K., Genetics Society of America 1997). L'ereditabilità in senso stretto (narrow-sense heritability) viene quindi indicata come h^2 fornendo una stima molto stringente dell'impatto dei geni sul fenotipo, dovuto solo alla sovrapporsi degli effetti additivi, quelli che effettivamente ricerchiamo nella nostra analisi associazione. Per escludere il clustering familiare di campionamento come una potenziale fonte di distorsione per le nostre misurazioni dell'ereditabilità, abbiamo aggiunto "lo stesso giorno di campionamento", come covariata al modello di base per la stima della ereditabilità per tutti i tratti di fratelli e genitori-prole coppie. Abbiamo trovato che la stima dell'ereditabilità correla quasi perfettamente ($r^2=0.99931$ and 0.99945 per fratelli e coppie genitore-figlio rispettivamente) con quella calcolata non includendo "lo stesso giorno di campionamento" come covariata, escludendo quindi possibili distorsioni legata alla scelta del campione.

Caratterizzazione genetica della coorte ProgeNIA

La coorte ProgeNIA è stata caratterizzata con quattro piattaforme di genotipizzazione (Illumina) OmniExpress, ExomeChips, Cardio-Metabochip e ImmunoChips progettate da consorzi internazionali per identificare regioni d'interesse correlate a tratti e/o malattie tra cui quelle legate al sistema metabolico e al sistema immunitario e integrata con i dati provenienti da mappe sardo specifiche ottenute attraverso il sequenziamento sull'intero genoma di 3514 individui sardi. Questo processo statistico detto di imputazione ci ha permesso di interrogare 26 milioni di varianti composte da 23 milioni di polimorfismi a singolo nucleotide e 3 milioni di INDELs per gli studi di associazione sull'intero genoma.

Sono stati applicati opportuni filtri di qualità sugli individui genotipizzati e sugli SNP secondo il metodo seguente. Tutti i campioni selezionati per le analisi avevano una soglia di call rate di genotipizzazione di > 98%, e gli SNP sono stati valutati attraverso una ulteriore serie di controlli di qualità con l'intento di ottenere un set di SNPs che presentassero la minima possibilità di errori di genotipizzazione. In particolare abbiamo rimosso i marker con una call rate <98%, con una forte deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) ($p < 10^{-6}$), monomorfici o che hanno mostrato un eccesso di errori mendeliani definita come > 1% delle famiglie studiate. Dall'integrazione di due array abbiamo ottenuto 283.955 SNPs autosomici di qualità accertata che sono stati usati come genotipo base per l'imputazione. Inoltre, 767 SNPs, che hanno superato il controllo di qualità di genotipizzazione direttamente sul cromosoma X, sono stati analizzati separatamente.

Analisi di associazione

L'analisi l'associazione è stata effettuata utilizzando il software Merlin, che applica un metodo della "componente a varianza" che tiene conto della parentela familiare (Chen W.M. e Abecasis G. *et al*, PLoS Genetics 2007). Per quanto riguarda le stime di ereditabilità, età e sesso sono stati inclusi come covariate e i tratti sono stati normalizzati utilizzando inverse normal transformation. Per adeguare il numero di test effettuati, abbiamo applicato una correzione per 95 test indipendenti che corrisponde al numero di popolazioni considerate come conta assoluta alla soglia di significatività genome-wide standard (5.0×10^{-8}) che in questo modo è stata diminuita, e resa più stringente, a 5.26×10^{-10} . In questo modo i nostri risultati saranno più robusti.

Ricerca delle associazioni coincidenti

La nostra strategia di studio è quella della ricerca di associazioni coincidenti tra patologie e tratti. Questa ricerca sistematica avviene attraverso la consultazione di informazioni genetiche provenienti da database pubblici GWAS CATALOG (www.genome.gov/gwastudies) e IMMUNOBASE (<http://www.immunobase.org/>), e attraverso la consultazione di database privati generati nei laboratori del nostro istituto. In particolare per questo studio abbiamo utilizzato un database costruito su una casistica di SM (~3000 pazienti) una casistica di controlli sani (~3000), casistiche indipendenti dalla coorte ProgeNIA.

RISULTATI E CONCLUSIONI

I risultati emersi dal nostro lavoro hanno dimostrato come atteso che una porzione rilevante della variazione dei livelli delle immunoglobuline IgM, IgA e IgG è geneticamente programmata e le stime dell'ereditabilità calcolate su 3950 individui appartenenti a 859 famiglie della coorte ProgeNIA, risultano essere pari al 52%, al 47% ed al 42%, rispettivamente. In linea con questo, anche le popolazioni delle cellule B e dei monociti, analizzate sia mediante citometria a flusso che mediante altri analizzatori, hanno mostrato che la loro varianza fenotipica era imputabile in misura del 40% circa ad una componente genetica. In particolare, la stima della componente genetica delle cellule B è stata quantificata mediante l'immunofenotipizzazione su un campione di 1629 volontari dei quali 1,418 erano raggruppati in 249 famiglie appartenenti alla stessa coorte.

Considerata l'elevata influenza della componente genetica nel determinare la variabilità dei tratti studiati, abbiamo condotto uno studio di associazione sull'intero genoma sui livelli sierici delle immunoglobuline IgA, IgM, IgG, e le sue sottoclassi di IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, e della proteina solubile BAFF. Dalla dissezione genetica di questi tratti immunologici, utilizzando un pannello di riferimento di sequenze sarde e dati pubblici derivanti dal progetto 1000 Genomi,

abbiamo trovato una variante composita che abbiamo denominato BAFF-var. Questa variante risulta significativamente associata ad un aumento dei livelli di BAFF solubile, dei linfociti B, delle immunoglobuline IgA, IgM e IgG come pure alle sottoclassi IgG1 e IgG3. Mentre le IgG2 e IgG4 risultano associate solo nominalmente. Inoltre la stessa variante risulta associata ad una diminuzione dei monociti (tabella 2).

Tabella 2

Tratto	n°campioni	Pvalue	Effetto della variante
IgA	2885	6,11E-09	0.1696 ↑
IgG1	2898	5,13E-14	0.2282 ↑
IgG2	2896	1,10E-03	0.09945 ↑
IgG3	2897	1.22E-05	0.1351 ↑
IgG4	2889	1,88E-04	0.1126 ↑
IgG	2886	2.64E-12	0.2141 ↑
IgM	2898	5.20E-08	0.1565 ↑
sBAFF	2827	8,50E-150	0,775 ↑
Linfociti B	4000	3,17E-20	0,264 ↑
Monociti	6000	1.73E-12	-0,148 ↓

La variante è localizzata nella regione 3' non tradotta (3'UTR) di TNFSF13B, e crea un nuovo sito di poliadenilazione che determina la produzione di un trascritto più breve. Questa osservazione suggerisce che il trascritto breve viene tradotto in maniera più efficiente in quanto la 3'UTR corta mancherebbe dei siti inibitori di controllo per microRNA e/o RNA Binding Protein. Questo è dimostrato oltre anche dai dati di quantificazione sul siero dei volontari ProgeNIA, che mostrano come i valori medi della quantità di proteina nel siero corrispondono 583.28 pg/ml, 728.53 pg/ml e 836,33 pg/ml negli omozigoti, eterozigoti ed omozigoti per BAFF-var, rispettivamente. La presenza dell'allele di rischio in omozigosi ed in eterozigosi causa un aumento rispettivamente del 43,5 % e del 24,5 % circa della proteina circolante rispetto alla condizione di omozigosi per l'allele protettivo.

Questo dato è confermato anche da una analisi parallela del trascrittoma caratterizzato sui leucociti circolanti con la tecnologia dell'RNAseq di 606 individui ProgeNIA per cui sono stati identificati ~ 31,000 eQTLs (expression Quantitative Trait Loci), ossia loci genetici che alterano i livelli di espressione di specifici geni. Da questa analisi emerge chiaramente come la variante in oggetto sia in grado di modificare l'espressione del trascritto. Quindi, la variante eQTL, attraverso meccanismi post-trascrizionali, causa un aumento di sBAFF che a sua volta determina, grazie alla sua funzione, un aumento generale delle cellule B un sottogruppo dei quali produce le immunoglobuline. In questo contesto, di un aumento delle cellule B in presenza della variante di predisposizione, ci fa supporre che l'aumento dei livelli delle immunoglobuline sia la risultante di un aumentato numero o funzionalità delle plasmacellule che sono la popolazione cellulare adibita alla produzione delle immunoglobuline. Tuttavia, questo è difficilmente valutabile nel sangue periferico che non rappresenta la sede di attività principale delle plasmacellule che è rappresentata da nicchie biologiche del midollo osseo; la proteina sBAFF ha il ruolo di sostenere la sopravvivenza delle plasmacellule nel midollo osseo in modo da garantire la produzione di immunoglobuline a lungo termine e la memoria immunologica (Benson M J *et al.*, *J.Imm* 2008). Ciò che invece risulta meno chiara è l'associazione con i ridotti livelli di monociti. Questo risultato potrebbe essere la conseguenza di un feedback negativo per l'aumento di sBAFF, essendo queste cellule tra i principali produttori di questa molecola, o può avere un ruolo più attivo nella malattia, che riflette un aumento del tasso di egresso dei monociti dal circolo ematico e la loro trasformazione in macrofagi in diversi siti, compreso il SNC, come dimostrato da un recente studio sul modello murino (Zouggari Y *et al.*, *Nat Med* 2013). Lo stesso studio postula che il meccanismo di aumentato egresso vascolare dei monociti sia a sua volta mediato dalle cellule B, su cui l'aumento di sBAFF avrebbe l'effetto principale, che producono una quantità maggiore del fattore solubile CCL7 (Chemokine (C-C motif) ligand 7 anche nota come monocyte-specific chemokine 3 (MCP3). Purtroppo, tale

proteina è difficilmente quantificabile nel siero isolato da individui sani quali i volontari ProgeNIA mentre i suoi livelli sono aumentati in diverse condizioni patologiche.

La variante identificata è molto più comune in Sardegna (MAF=26,5%) rispetto al resto d'Italia (MAF=5,7%) e ancor di più al nord Europa (MAF=1.8%), o addirittura assente come in Africa e Asia. Tale differenza di frequenze è presumibilmente causata dalla forte pressione selettiva esercitata da diversi fattori ambientali primo tra tutti la malaria, che è stata una malattia endemica in Sardegna fino alla sua eradicazione avvenuta tra il 1946 ed il 1950. In linea con questo, modelli murini di malaria causata dal *Plasmodium yoelii* mostrano come elevati livelli circolanti di BAFF conferiscano protezione nei confronti delle infezioni letali di malaria (Liu X.Q. *et al.*, Eur. J. Immunol 2012). Altri studi su *Plasmodium* dimostrano come l'infezione da parte di questo parassita determini una alterata differenziazione delle cellule B anche attraverso la modulazione e riduzione dell'espressione di BAFF (Scholzen A. *et al.*, Cell Press 2013).

In conclusione i nostri studi dimostrano ancora una volta come la popolazione sarda, e in particolare quella appartenente all'Ogliastra, sia particolarmente adatta per gli studi genetici dei tratti complessi. Il particolare corredo genetico della popolazione sarda consente di sezionare le patologie complesse senza necessità di una coorte campionaria eccessivamente numerosa. Inoltre, la strategia utilizzata per l'analisi dei tratti quantitativi da noi eseguita sulla popolazione generale piuttosto che lo studio degli stessi tratti sfruttando un approccio caso controllo, offre due vantaggi principali a) può essere facilmente effettuata in un'ampia casistica, b) non è soggetta a fattori confondenti rappresentati dalle terapie farmacologiche in atto.

L'approccio della ricerca delle associazioni coincidenti, riveste una grande importanza in quanto consente di individuare i punti di sovrapposizione tra tratti quantitativi e malattie complesse che sono indicativi di meccanismi patogenetici causali. Infatti, se la variazione quantitativa di una molecola è associata ad una variante genetica o a più varianti genetiche, che sono anche associate ad una malattia, allora la stessa molecola è potenzialmente coinvolta nella

patogenesi di tale malattia. Questo ci permette di individuare i meccanismi biologici alla base della predisposizione alle malattie autoimmuni e alla SM in particolare. L'integrazione delle informazioni genetiche con quelle derivanti da futuri studi funzionali rappresentano un punto di partenza per la progettazione di terapie farmacologiche mirate che consentono di agire sulla malattia in modo selettivo e specifico, consentendo di superare le attuali problematiche terapeutiche caratterizzate da una parziale efficacia e accompagnate da numerosi effetti collaterali e tossici.

BIBLIOGRAFIA

- Benson M.J. *et al.*, Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL1. *The Journal of Immunology*, 2008.
- Castigli E. *et al.*, TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 2005.
- Chen S.J. *et al.*, Current status of the immunomodulation and immunomediated therapeutic strategies for Multiple Sclerosis. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.
- Chen W.W. e Abecasis G. *et al.*, Genome-Wide Association Scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genetics* 2007.
- Compston A. Coles A., Multiple sclerosis. *Lancet*, 2008.
- Cuper G. S. *et al.*, Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. *Journal Autoimmunity*, 2009.
- Davis M. M. *et al.*, Prescription for human immunology. *Immunity*, 2008.
- Fitzner B. *et al.*, Molecular biomarkers in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Autoimmunity reviews*, 2015.
- Francalacci P. *et al.*, Low-pass DNA sequencing of 1200 sardinians reconstructs european Y-chromosome phylogeny. *Science*, 2013.
- Gregory S. G. *et al.*, Interleukin 7 receptor a chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nature Genetics*, 2007.
- Heliö T. *et al.*, CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut*, 2003.
- Jostins L. *et al.*, Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 2012.

- Krumbolt M. *et al.*, B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nature Reviews Neurology*, 2012.
- Kyle K.H.F. *et al.*, Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature* 2015
- Lange K., An approximate model of polygenic inheritance. *Genetics Society of America*, 1997.
- Liu X. Q. *et al.*, Malaria infection alters the expression of B-cell activating factor resulting in diminished memory antibody responses and survival. *European Journal Immunology*, 2012.
- Lundmark F. *et al.*, Variation in interleukin 7 receptor a chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nature Genetics*, 2007.
- Mackay F. and Pascal Schneider. Cracking the BAFF code. *Nature Reviews Immunology*, 2009.
- Marrosu M. G. *et al.*, DRB1–DQA1–DQB1 loci and multiple sclerosis predisposition in the Sardinian population. *Human Molecular Genetics*, 1998.
- McFarland H. F. *et al.*, and Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature Immunology*, 2007.
- Meinel E. *et al.*, B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Annals of Neurology*, 2006.
- Neuhaus O. *et al.*, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the interferon-betas, glatiramer acetate, and mitoxantrone in multiple sclerosis. *Journal of Neurological Sciences*, 2007.
- Orrù V. *et al.*, Genetic variants regulating immune cell levels in health and disease. *Cell*, 2013.

- Pilia G. *et al.*, Heritability of cardiovascular and personality traits in 6,148 Sardinians. *PLoS Genetics*, 2006.
- Polman C. H. *et al.*, Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria. *Annals of Neurology*, 2011.
- Pröbstel A.K. *et al.*, B cells and autoantibodies in Multiple Sclerosis. *International Journal of Molecular. Science*, 2015.
- Pugliatti M. *et al.*, The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *European Journal Neurology*, 2006.
- Sardu C. *et al.* Population based study of 12 autoimmune diseases in Sardinia, Italy: Prevalence and Comorbidity. *PLoS One*, 2012.
- Scholzen A. e Sauerwein R.W. How malaria modulates memory: activation and dysregulation of B cells in *Plasmodium* infection. *Trends in Parasitology*, 2013.
- Stangel M. *et al.*, The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 2013.
- The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). Evidence for polygenic susceptibility to Multiple Sclerosis. The shape of things to come. *The American Journal of Human Genetics*, 2010.
- The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nature Genetics*, 2013.
- Willer C J. *et al.*, Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003.
- Zouggari Y. *et al.*, B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nature Medicine*, 2013.