



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

**DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA E ONCOLOGIA CHIRURGICA
XXI CICLO**

**MECCANISMI PATOGENETICI DELLA MALATTIA
LINFOPROLIFERATIVA DEI LINFOCITI
GRANULATI**

Coordinatore: Ch.ma Prof.ssa PAOLA ZANOVELLO

Supervisore: Ch.mo Prof. GIANPIETRO SEMENZATO

Correlatore: Dott. RENATO ZAMBELLO

Dottoranda: Dott.ssa ANTONELLA TERAMO

2 febbraio 2009

INDICE

ABBREVIAZIONI	pag. 3
RIASSUNTO	pag. 5
ABSTRACT	pag. 7
INTRODUZIONE	pag. 9
La malattia linfoproliferativa dei linfociti granulati (LDGL)	pag. 9
Generalità della LDGL	pag. 9
NK-LDGL	pag. 10
T-LDGL	pag. 10
Eziologia della LDGL	pag. 11
I Killer Ig-like Receptor (KIR)	pag. 12
Il ruolo dei KIR per le cellule NK	pag. 15
La regione genomica dei KIR	pag. 16
La regolazione dell'espressione dei KIR	pag. 20
La cascata molecolare JAK/STAT	pag. 22
La proteina SOCS3	pag. 23
Le cellule dendritiche (DC) nella LDGL	pag. 24
CXCL16	pag. 26
SCOPO DELLA TESI	pag. 29
MATERIALI E METODI	pag. 31
Pazienti e controlli	pag. 31
Separazione dei linfociti da sangue periferico	pag. 31
Analisi citofluorimetrica e <i>sorting</i> dei GL	pag. 32
Purificazione dei GL mediante biglie immuno-magnetiche	pag. 33
Analisi molecolare	pag. 34
Estrazione del DNA	pag. 34
Estrazione dell'RNA	pag. 35
Analisi del genotipo KIR	pag. 35
Analisi dell'espressione genica dei KIR 3DL1 e 3DS1	pag. 41
Analisi dell'espressione genica di DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, STAT3 e SOCS	pag. 43
Analisi del <i>pattern</i> di metilazione dei geni KIR3DL1 e KIR3DS1	pag. 44
Modificazione del DNA con sale di bisolfito	pag. 44
PCR sul DNA modificato	pag. 45
Clonaggio del prodotto di PCR	pag. 47
Controllo del clonaggio mediante restrizione	pag. 50
Sequenziamento	pag. 50
Screening delle isole CpG metilate	pag. 52
Colture cellulari	pag. 52
Test di valutazione dell'apoptosi mediante annessina V	pag. 53
Allestimento preparati per microscopio confocale	pag. 54
Patching	pag. 54
Analisi statistica	pag. 55
RISULTATI	pag. 57
DISCUSSIONE	pag. 79
BIBLIOGRAFIA	pag. 85
ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI	pag. 93

ABBREVIAZIONI

AcMo	Anticorpo monoclonale
Ag	Antigeni
ADCC	Citotossicità cellulare anticorpo dipendente
AML	Leucemia mieloide acuta
ANKL	Aggressive natural killer-cell leukemia
CD	Cluster differentiation
CML	Leucemia mieloide cronica
CTB	Cholera Toxin B
CTL	Linfociti T citotossici
DC	Cellule Dendritiche
DEX	Desametazone
DMSO	Dimetil solfossido
DNMT	DNA metil transferasi
EBV	Epstein Barr virus
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAB	French-American-British
F/H	Ficoll/Hypaque
FITC	Fluoresceina isotiocianato
GL	Linfociti granulati
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
HIV	Virus umano dell'immunodeficienza
HLA	Antigene di istocompatibilità
Ig	Immunoglobulina
IL	Interleuchina
ILT	Immunoglobulin-like transcript
INF	Interferone
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
JAK	Janus chinasi
KAR	Killer activating receptor
Kb	kilo basi
KIR	Killer immunoglobulin-like receptors
KLR	Killer lectin-like receptor
LAIR	Leucocyte-associated inhibitory receptor
LDGL	Malattia linfoproliferativa dei linfociti granulati
LGL	Large granular lymphocyte
LIR	Leukocyte immunoglobulin-like receptors
LRC	Leucocyte receptor complex
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
MAP	Mitogen-activated protein
MCS	Multiple cloning site
mDC	Cellule dendritiche mieloidi
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MHC	Major histocompatibility complex
MIC	Morphologic, Immunologic and Cytogenetic Study Group
mRNA	RNA messaggero
NCR	Recettore di citotossicità naturale
NK	Natural killer

NKR	Natural killer receptor
O/N	Over night
PBL	Linfociti da sangue periferico
PBMC	Cellule mononucleate del sangue periferico
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Reazione a catena della polimerasi
pDC	Cellule dendritiche plasmocitoidi
PE	Ficoeritrina
PI3K	Fosfoinositol-3 chinasi
PMN	Cellule polimorfonucleate
Pz	Paziente
RBC	Red blood cell
REAL	Revised European and American Lymphoma
RFU	Unità di fluorescenza relativa
RNasi	Ribonucleasi
RNasin	Inibitore delle RNasi
RT-PCR	Reverse-transcription PCR
SDS	Sequence detection system
SH2	Src homology
SHP	Src homology 2 domain-containing phosphatase
SMC	Smooth muscle cell
SOCS	Soppressore di Segnale Citochinico
SSP	Primer sequenza-specifici
STAT	Trasduttore di Segnale e Attivatore di Trascrizione
TAE	Tampone tris-acetato
TBE	Tampone tris-borato
TCR	T cell receptor
T-LLC	Leucemia linfatica cronica di tipo T
T _m	Temperatura di melting
TNF	Tumor Necrosis Factor
TSA	Tricostatina
TSR	Template suppression reagent
UNG	Uracil N-glicosilasi
WHO	World Health Organization
wt	Wild type
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
ZAP70	Proteina associata alla catena ζ di 70 kDalton

RIASSUNTO

La malattia linfoproliferativa dei linfociti granulati (LDGL) è una malattia rara caratterizzata da una linfocitosi cronica dei linfociti granulati (GL). Da un punto di vista immunologico, si distinguono due forme di LDGL, la T-LDGL, caratterizzata dalla proliferazione di GL CD3⁺ CD16⁺, e la NK-LDGL caratterizzata dalla proliferazione di GL CD3⁻ CD16⁺.

L'eziopatogenesi della LDGL rimane attualmente materia di dibattito, gli studi condotti finora hanno permesso la formulazione di un'ipotesi patogenetica a favore della tesi che il clone cellulare in espansione sia inizialmente indotto a proliferare in risposta ad uno stimolo, probabilmente virale, per cui si crea una risposta immunitaria che successivamente si protrae nel tempo a causa di un evento ancora sconosciuto che potrebbe essere una continua stimolazione citochinica o una protratta presentazione dell'antigene scatenante. Nella fase di innesco si pensa siano positivamente selezionate a costituire il clone in espansione le cellule caratterizzate da profili fenotipici maggiormente reattivi, quali cellule NK o linfociti T contraddistinti da recettori attivanti le loro funzioni citotossiche. Inoltre, si ritiene che i GL posseggano alterazioni molecolari che porterebbero alla perdita dell'equilibrio vita-morte cellulare risultante nella linfocitosi caratterizzante la LDGL. Nella fase del mantenimento della linfocitosi, invece, si ritiene entrino in gioco le cellule dendritiche (DC) tramite secrezione di citochine, quali l'IL-2 e l'IL-15, e tramite prosecuzione della presentazione antigenica.

Al fine di definire meglio queste ipotesi, nel nostro laboratorio sono state sviluppate diverse linee di indagine su entrambe le forme di LDGL, T ed NK.

Per quanto riguarda la NK-LDGL, un primo oggetto di studio sono stati i *Killer Immunoglobulin-like Receptor* (KIR), recettori classificati in attivatori e inibitori in base al tipo di segnale che sono in grado di mediare. La forma attivatoria dei KIR conferisce alle cellule NK carattere citotossico/reattivo. Tramite PCR su DNA, abbiamo rilevato nei pazienti un'augmentata presenza di geni KIR attivatori rispetto ai controlli sani e la presenza di genotipi KIR caratteristici dei pazienti. I risultati ottenuti hanno evidenziato nei pazienti una predisposizione genica alla malattia che conferisce ai GL CD3⁻ un fenotipo maggiormente reattivo.

Il riconoscimento dell'effettiva importanza dei geni attivatori, insieme a nostri dati preliminari che indicavano la tendenza dei pazienti ad esprimere il recettore attivatorio KIR3DS1 rispetto al corrispondente inibitorio KIR3DL1, ci hanno successivamente spinto a

studiare questa coppia di recettori. Abbiamo quindi indagato se il principale meccanismo epigenetico dell'espressione genica, la metilazione, fosse responsabile dello sbilanciamento a favore dell'espressione del recettore KIR3DS1 attivatore su quello inibitore 3DL1 nei GL dei pazienti. I risultati hanno rilevato un'alterazione a carico del meccanismo di metilazione che risulta nella tendenza dei GL patologici a silenziare in maniera molto intensa il KIR3DL1 contribuendo alla costituzione nei pazienti di un pool di GL più reattivi rispetto ai controlli normali.

Nell'ambito della LDGL sostenuta dalle cellule T, abbiamo preso in esame il *pathway* molecolare JAK/STAT (Janus chinasi/trasduttore di segnale e attivatore di trascrizione). È riportato in letteratura che i GL dei pazienti hanno alti livelli d'espressione di STAT3 in forma attivata, suggerendo che tale proteina contribuisca all'accumulo clonale delle cellule patologiche. L'obiettivo del nostro studio è stato quello di analizzare, tramite *Real Time-PCR*, il *pattern* d'espressione della proteina SOCS3, principale inibitore di STAT3. I risultati hanno indicato che la proteina SOCS3 nei GL patologici, non solo esibisce bassi livelli di mRNA, come avviene nelle cellule quiescenti dove STAT3 risulta poco espresso, ma dimostra anche di non essere in grado di aumentare i propri livelli di mRNA in risposta allo stimolo dell'IL-6, manifestando una mancanza d'efficienza dei meccanismi regolatori del *pathway* JAK/STAT nei pazienti.

Un ultimo obiettivo di ricerca che coinvolge entrambe le forme di LDGL, si è sviluppato dal riscontro, tramite osservazione citofluorimetrica, di una peculiare *over*-espressione di CXCL16 sulle DC di un piccolo gruppo di pazienti, soprattutto a livello midollare. Lo scopo è stato, quindi, quello di indagare una possibile funzione di questa chemochina nella LDGL e quello di verificare il suo coinvolgimento, insieme al suo recettore CXCR6 presente sui GL, nel *cross-talk* tra DC e GL. I dati raccolti hanno confermato su un ampio gruppo di pazienti la elevata espressione di questa chemochina a livello midollare e la sua positiva influenza sul prevenire l'apoptosi dei GL. Inoltre, tramite osservazioni al microscopio confocale, abbiamo rilevato la sua localizzazione con CXCR6 nel sito di contatto tra DC e GL suggerendo che le DC giochino il loro ruolo chiave nella LDGL tramite CXCL16.

L'insieme dei risultati prodotti durante questo progetto di ricerca sono in linea con i dati precedentemente pubblicati dal nostro gruppo e contribuiscono a definire nuovi aspetti nella comprensione della patogenesi e del decorso della LDGL.

ABSTRACT

The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes (LDGL) is a rare disease characterized by chronic proliferation of granular lymphocytes (GLs). According to the immunologic analysis, the proliferating lymphocytes belong to the T cell lineage, T-LDGL (CD3+), or are represented by natural killer cells, NK-LDGL (CD3- CD16+).

The pathogenesis of this disorder is still a matter of debate. Recent studies suggest that a stimulus, likely of viral origin, would induce GLs to proliferate. The proliferation and survival of the neoplastic clone is likely to be further sustained by unknown events, such as cytokine stimulus (mostly IL-15) or an extending antigenic presentation. The possibility that GLs display molecular alterations that affect survival resulting in LDGL lymphocytosis has been also suggested. Moreover, during the lymphocytosis phase, dendritic cells (DCs) would play a role by secreting cytokines, such as IL-2 and IL-15, and by continuing to present antigen.

To better define the pathogenetic mechanisms of this disorder, in our laboratory several lines of investigation have been pursued both on T and NK LDGLs.

Regarding NK-LDGL, in this project research, we studied the *Killer Immunoglobulin-like Receptors* (KIRs) expressed on the surface of NK-cells. According to the signal they can mediate, these receptors are classified into activating and inhibitory receptors. The activating KIRs confer a cytotoxic phenotype to NK cells. In this study, by PCR on genomic DNA, we found an higher presence of activating KIR genes in LDGL patients as compared to controls. This result suggested that a genetic predisposition would confer to CD3- GLs a more reactive phenotype and pointed out the importance of the activating phenotype in the pathogenesis and clinical course of this disorder. In agreement with this result our preliminary data indicated the tendency of patients to express the activating gene KIR3DS1 rather than the equivalent inhibitory KIR3DL1. When we evaluated if DNA methylation could be responsible of KIR3DL1 silencing, we found an altered methylation of KIR3D1 promoter, that explained the silencing of KIR3DL1 in the GLs contributing to generate a more reactive GL pool in patients as compared to controls.

Regarding T-LDGL, we examined the molecular pathway JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and transcription activator). It is reported in literature that GLs of T-LDGL patients present high levels of activated STAT3, suggesting that this transcription factor could play a role to favour the pathological cells expansion. Considering these findings, by *Real Time*-PCR, we evaluated the expression pattern of SOCS3 protein, i.e. the principal

STAT3 inhibitor. We found that in pathological cells SOCS3 exhibited low mRNA levels, as commonly occurs in quiescent cells where STAT3 is expressed at low levels. Moreover, SOCS3 resulted unable to increase its expression after IL-6 stimulus, showing a defect on regulatory mechanisms of JAK/STAT pathway.

Finally, our previous observations, by flow cytometry analysis, that DCs of a small group of LDGL patients overexpressed the chemokine CXCL16, mostly in bone marrow, prompted us to investigate the putative function of this chemokine in LDGL and the role of its receptor CXCR6, expressed by GLs, in DC-GL cross-talk. The data obtained on a large group of patients confirmed the high expression of this chemokine in bone marrow, demonstrating its positive influence on the prolonged survival of GLs. Moreover, by confocal microscopy, we found CXCL16 with its receptor CXCR6 in the contact site between DC and GL, suggesting an important role of CXCL16 in DCs activity and DC-GL cross-talk.

Overall, these results confirm and complete our previously published data and contribute to get new insights into the pathogenesis and development of LDGL.

INTRODUZIONE

LA MALATTIA LINFOPROLIFERATIVA DEI LINFOCITI GRANULATI (LDGL)

Generalità della LDGL

La malattia linfoproliferativa dei linfociti granulati (LDGL) rappresenta una rara, ma ben definita patologia, caratterizzata dalla presenza di una linfocitosi cronica sostenuta da linfociti con tipiche granulazioni citoplasmatiche, definiti linfociti granulati (GL). I GL sono cellule di dimensioni medio-grandi (15-18 μm) con nucleo eccentrico, reniforme o rotondo, e citoplasma abbondante, ricco dei caratteristici granuli azzurrofil¹. Essi rappresentano il 10-15% delle cellule mononucleate del sangue periferico e possono essere suddivisi in due gruppi: i GL di tipo NK e quelli di tipo T. In un individuo adulto normale, la maggior parte di queste cellule (85%) è rappresentata da cellule NK, la restante porzione (15%) è invece rappresentata da cellule T².

I GL di tipo NK appartengono al sistema immunitario innato e hanno capacità citotossica non MHC-ristretta. Essi sono caratterizzati dal fenotipo CD3- CD16+ CD56+ e da una configurazione di tipo germinativo del recettore per l'antigene dei linfociti T (TCR)^{3,4}.

I GL di tipo T, invece, esprimono un fenotipo CD3+ CD16+, vanno incontro a riarrangiamento del TCR e sono in grado di mediare, in vitro, un'attività citotossica MHC-ristretta. Si ritiene che queste cellule rappresentino, in vivo, linfociti T citotossici (CTL) attivati⁵.

Attualmente, sulla base delle caratteristiche fenotipiche dei linfociti granulati, si distinguono due gruppi principali di pazienti: il primo, che include circa l'85% di tutti i casi di LDGL, è caratterizzato dalla proliferazione di GL CD3+, ossia di origine T (T-LDGL), ed evidenzia generalmente un riarrangiamento monoclonale del TCR⁴; il secondo gruppo è caratterizzato dalla proliferazione di GL CD3-, ossia di origine NK (NK-LDGL), per i quali non vi è un definito marcatore di monoclonalità^{2,6}.

Sebbene siano descritti casi pediatrici^{7,8}, la malattia colpisce soprattutto persone anziane (media 60 anni); generalmente meno del 10% dei pazienti ha un'età inferiore ai 40 anni. La malattia presenta un decorso iniziale asintomatico in circa il 40% dei casi, dove la linfocitosi rappresenta l'unica anomalia ematologica riscontrabile. Nei restanti casi, la malattia è caratterizzata da sintomi correlati principalmente alla neutropenia e/o all'anemia.

Le caratteristiche fondamentali dei pazienti con LDGL possono essere così riassunte: moderata linfocitosi, di solito inferiore a 20.000 cellule/mm³, sostenuta da GL; presenza di anemia e/o neutropenia; decorso clinico cronico (>6 mesi) e generalmente non progressivo; frequente associazione con malattie croniche quali infezioni virali, disordini autoimmuni (es. artrite reumatoide) o neoplasie^{4,6,9}.

La LDGL di tipo NK

La LDGL di tipo NK è contraddistinta dalla proliferazione di linfociti granulati caratterizzati dal seguente fenotipo: CD3-, CD4-, CD8-, CD16+, CD56+ e CD57+/-.

Si tratta di una patologia prevalentemente asintomatica, tuttavia i pazienti possono presentare sintomi correlati all'anemia e/o alla neutropenia. Da studi *in vivo* è emerso il coinvolgimento dell'espansione patologica dei GL nell'inibizione dell'eritropoesi¹⁰, dovuta alla capacità delle cellule proliferanti di sopprimere la formazione di colonie eritroidi. Parallelamente, la neutropenia potrebbe essere secondaria ad una soppressione cellulo-mediata dei precursori mieloidi in seguito al rilascio di interleuchina 2 (IL-2) ed interferone γ (INF- γ) da parte delle cellule NK proliferanti¹¹. Alternativamente, potrebbe essere coinvolta una deficienza funzionale di GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*)¹². Studi di citotossicità condotti *in vitro* mostrano una marcata attività citotossica sia cellulo-mediata che anticorpo-dipendente¹³.

Una rara variante della NK-LDGL, l'*aggressive natural killer-cell leukemia* (ANKL), è stata descritta per lo più in Giappone, con sporadici casi nei Paesi Occidentali. Questa patologia è caratterizzata da una proliferazione sistemica di linfociti NK, fenotipicamente identificati come CD16- CD56+ CD57- e presenta un decorso clinico aggressivo, nella maggior parte dei casi fatale¹⁴.

La LDGL di tipo T

La diagnosi di T-LDGL si basa sul riscontro di una linfocitosi sostenuta da GL con un immunofenotipo caratteristico dei linfociti T citotossici (CD3+, CD8+, CD57+) e sulla dimostrazione della clonalità della linfocitosi tramite studio del riarrangiamento del gene del TCR β e γ ¹⁵.

Sono stati descritti casi di associazione tra T-LDGL e patologie con disfunzione midollare come sindromi mielodisplastiche, anemia aplastica e emoglobinuria parossistica

notturna. Nel 25-35% dei casi, inoltre, si è osservata un'associazione con patologie autoimmuni, come l'artrite reumatoide (AR), la sindrome di Sjögren (SS) o, più raramente, il lupus eritematoso sistemico (LES) e la tiroidite di Hashimoto. Prima di stabilire la diagnosi di T-LDGL è importante escludere tutte le linfocitosi reattive sostenute da GL. Aumenti transitori o policlonali dei GL possono essere dovuti a infezioni virali o a patologie autoimmuni. L'invecchiamento favorisce, invece, aumenti di tipo oligoclonale/monoclonale. Popolazioni clonali di GL CD3+ sono state osservate in pazienti dopo il trapianto d'organo².

EZIOLOGIA DELLA LDGL

L'eziologia di questa malattia è ancora materia di dibattito. Tra le ipotesi più accreditate c'è quella che sostiene vi sia un agente esogeno, probabilmente virale, che vada preferenzialmente a stimolare la proliferazione clonale di una cellula specificamente selezionata per particolari caratteristiche e che successivamente la linfocitosi venga mantenuta nel tempo a causa di una protratta stimolazione antigenica e citochinica (figura 1). Le caratteristiche che rendono i GL dei possibili candidati a costituire la linfocitosi sono differenti in base al tipo di LDGL in questione.

Nella LDGL-NK recenti studi immunofenotipici e funzionali hanno evidenziato la tendenza delle cellule NK patologiche ad esprimere un maggior numero di KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptor*) attivatori, facendo quindi supporre che cellule arricchite di questo tipo di recettori siano selezionate dall'agente che innesca la proliferazione cellulare¹³. I KIR si prestano a questa ipotesi, essendo essi responsabili dell'attivazione delle cellule NK a rispondere a minacce quali cellule tumorali o infettate da virus^{16,17}.

Nella T-LDGL le cellule in espansione spesso manifestano un fenotipo sovrapponibile quasi interamente a quello dei linfociti T citotossici maturi, come fossero stimolati contro un antigene sconosciuto. Oltre alla espressione di recettori citotossici, dati funzionali hanno indicato che i GL hanno potenzialità citotossiche ed esprimono costitutivamente enzimi citolitici quali "perforin" e "granzyme" e *up*-regolano proteasi citotossiche^{18,19}. Un'altra caratteristica che identifica i GL-CD3+ patologici è che spesso manifestano un'alterata regolazione di diverse vie di trasduzione del segnale intracellulare (FAS/FAS-L, PI3K, MAP/ERK, JAK/STAT), che porta all'inibizione dell'apoptosi, con conseguente accumulo di GL²⁰.

Alcuni dati conferiscono alle cellule dendritiche (DC) un ruolo critico nella fase del mantenimento nel tempo della linfocitosi²¹. Sebbene un loro diretto coinvolgimento non sia

ancora stato definitivamente dimostrato, si ipotizza che, inizialmente, sono le DC le responsabili dell'*imprinting* antigenico e che sono loro che continuano a stimolare i GL a mantenersi in proliferazione continuando a dare segnali di stato infiammatorio in corso. In effetti, il quadro patologico dei pazienti è paragonabile ad uno stato infiammatorio che non giunge a risoluzione. Il coinvolgimento delle DC è stato ipotizzato grazie a dati immunohistochimici che hanno individuato la stretta colocalizzazione di DC e GL nel midollo osseo dei pazienti affetti e dopo analisi in vitro che hanno dimostrato come i GL patologici siano spinti a proliferare se messi in cocoltura con le DC²¹. Inoltre, dati di letteratura affermano che nella LDGL un ruolo chiave nella proliferazione venga svolto da alcune citochine, quali l'IL-2 e l'IL-15, secrete da cellule di linea monocito-macrofagica, quali appunto le DC²².

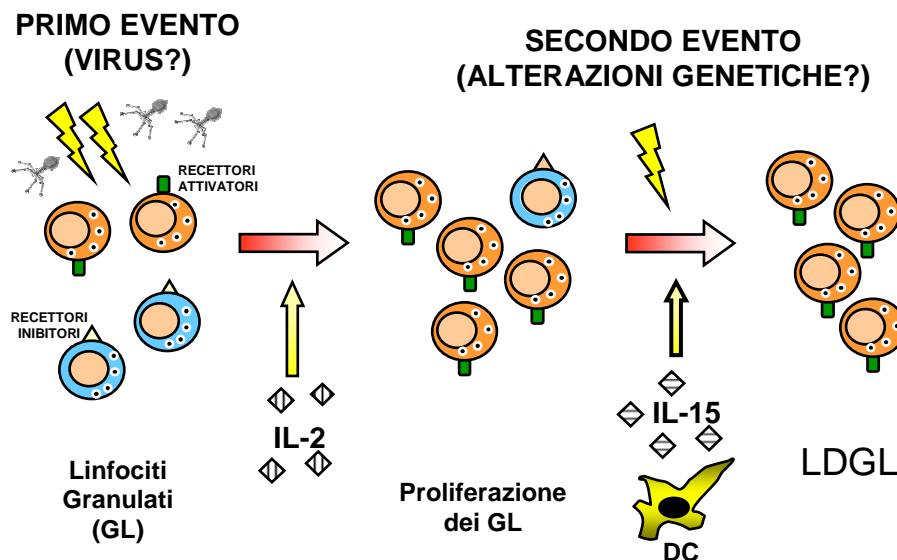


Figura 1. Illustrazione schematica degli eventi patogenetici ipotetici che potrebbero portare allo sviluppo della LDGL¹³.

I KILLER IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR (KIR)

Diversi studi hanno dimostrato l'importanza dell'analisi di espressione dei recettori delle cellule NK, come parametro diagnostico, suggerendone il potenziale utilizzo come marcatore clonale¹³. Diverse analisi dei recettori delle cellule NK, tramite l'utilizzo di Ac specifici, hanno permesso di individuare nei pazienti l'espressione ristretta di un determinato KIR^{23,24}, differenziando quindi le cellule NK di LDGL da una popolazione NK normale, solitamente caratterizzata dall'omogenea espressione dei diversi recettori²⁴.

I KIR sono recettori a singola catena, appartenenti alla famiglia delle immunoglobuline. Ognuno di questi recettori riconosce un determinato set di molecole HLA di classe I (tabella 1). La loro tipizzazione molecolare ha evidenziato come molecole codificate da diversi mRNA possano mostrare la stessa specificità allelica, ma reattività opposta. Questo fenomeno è stato spiegato con la scoperta che molti KIR sono tra loro omologhi per quanto riguarda la porzione extracellulare, responsabile del loro riconoscimento HLA-ristretto, mentre differiscono per quanto riguarda i domini transmembrana e citoplasmatico.

Tabella 1. Caratteristiche strutturali e specificità di legame dei recettori KIR. Nelle due colonne di destra sono indicati rispettivamente gli anticorpi monoclonali specifici per i diversi KIR e la loro denominazione secondo il *cluster* di differenziazione (CD)

KIR	Domini Ig	Residuo	LIGANDO	AcMo
2DL1	D1-D2	-	HLA-C gruppo 2	EB6
2DL2,3	D1-D2	-	HLA-C gruppo 1	GL183
2DL4	D0-D2	Arg	HLA-G	-
2DL5.1	D0-D2	-	-	-
2DL5.2	D0-D2	-	-	-
2DS1	D1-D2	Lys	HLA-C gruppo 2	EB6
2DS2	D1-D2	Lys	HLA-C gruppo 1	GL183
2DS3,5	D1-D2	Lys	-	-
2DS4	D1-D2	Lys	-	FEST172
1D	-	-	-	-
3DL1	D0-D1-D2	-	HLA-Bw4	Z27/DX9
3DL2	D0-D1-D2	-	HLA-A	Q66
3DS1	D0-D1-D2	Lys	-	Z27

Non si conoscono ancora tutti i ligandi per ciascun KIR attivatorio, ma vista la loro frequente omologia con le controparti inibitorie, si ritiene che riconoscano lo stesso allele HLA-I. È importante anche notare che non c'è un KIR per ogni specifica molecola MHC-I, ma che ogni coppia di KIR riconosce determinanti condivisi da un gruppo di molecole MHC-I. Inoltre i KIR specifici per molte molecole HLA-A e HLA-B non esistono e, di conseguenza, HLA-C è l'isotipo di classe I maggiormente coinvolto nella regolazione della funzione delle cellule NK³.

I KIR possiedono una specifica nomenclatura, che è in grado di distinguerli uno dall'altro (figura 2).

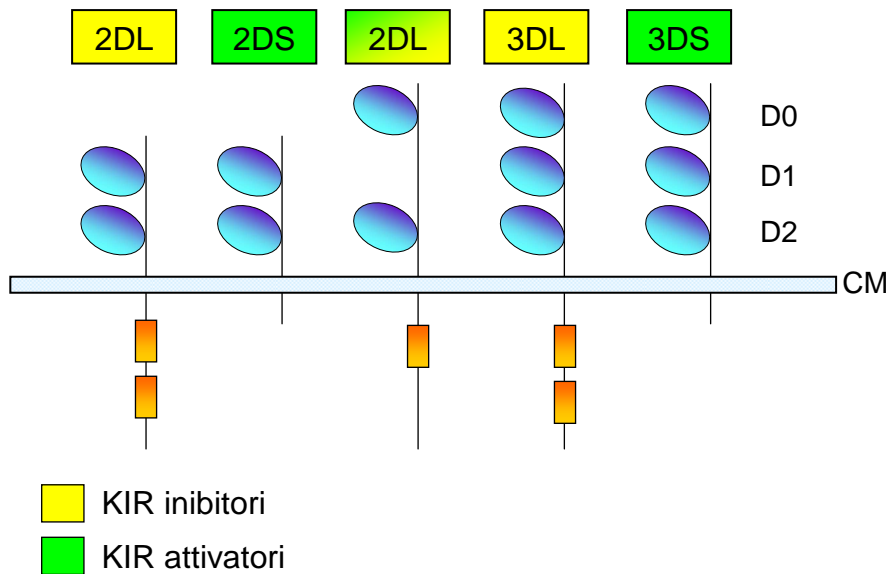


Figura 2. I recettori KIR. CM=membrana cellulare. D=dominio immunoglobulinico extracellulare²⁵.

A seconda che abbiano rispettivamente 2 o 3 domini immunoglobulino-simili essi vengono denominati con i suffissi 2D (p58/p50) e 3D (p70/p140). Le lettere L (*Long*) e S (*Short*) indicano invece se i recettori possiedono un dominio intracitoplasmatico lungo o corto, che corrisponde, rispettivamente, ad un'attività inibitoria o attivatoria²⁵.

L'unica eccezione a questa regola è rappresentata dal KIR2DL4, che, pur possedendo un dominio citoplasmatico di tipo inibitorio, media un segnale di tipo attivatorio, attraverso l'interazione con una proteina accessoria. Questo KIR inoltre sembra essere l'unico a non avere una controparte con un dominio intracitoplasmatico corto e, a differenza degli altri KIR, si è visto che esso non ha una distribuzione clonale, ma è invece espresso in tutte le cellule NK³.

Nella denominazione dei KIR, infine, il numero che segue la lettera L o S identifica ciascun gene/molecola e le cifre dopo l'asterisco caratterizzano l'allele (figura 3).

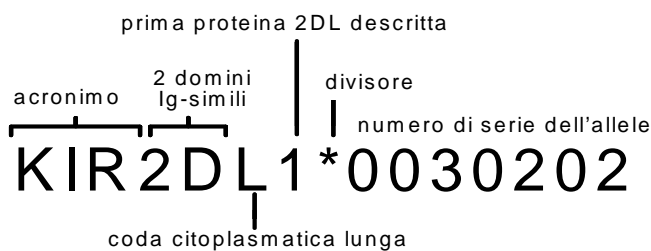


Figura 3. Designazione genica dei geni KIR; nell'esempio è rappresentato un allele di un KIR inibitorio.

La distribuzione dei KIR all'interno di una popolazione di cellule NK di un individuo è eterogenea²⁶. I geni KIR posseduti da una persona non vengono espressi necessariamente in tutte le cellule NK e quindi ogni cellula ha un fenotipo KIR caratteristico. Una volta che una cellula è stata indirizzata ad esprimere una particolare combinazione di geni KIR, il *pattern* di espressione rimane stabile nel tempo e durante la divisione cellulare²⁷.

Il ruolo dei KIR per le cellule NK

Visto l'elevato numero di recettori presenti sulla superficie cellulare, la loro attività deve essere regolata e coordinata finemente per ottenere la funzione richiesta (attivatoria o inibitoria).

I recettori inibitori. Si ritiene che questa sottoclasse dei KIR abbia il compito di proteggere le cellule normali da aggressioni autologhe da parte delle cellule NK. I KIR inibitori, infatti, mediano il loro segnale in presenza, sulla superficie delle cellule bersaglio, dei loro ligandi HLA-I. Nel caso in cui vi sia una *down*-regolazione di tali recettori, ad esempio nel caso di infezioni virali o trasformazioni neoplastiche, essi non sono più in grado di mediare il loro segnale inibitorio e, di conseguenza, le cellule bersaglio diventano suscettibili alla lisi da parte delle cellule NK²⁸.

I recettori attivatori. Il loro ruolo non è ancora del tutto chiarito, tanto più che nella stessa cellula possono essere presenti coppie di KIR con attività opposta. Questi recettori riconoscono il ligando con meno affinità rispetto alla controparte inibitoria e si ritiene quindi che la loro azione stimolatoria sull'attività citotossica e sulla produzione di citochine possa verificarsi solo nel caso in cui, nello stesso momento, il segnale inibitorio sia *down*-regolato, scendendo sotto una soglia critica. Questo meccanismo, probabilmente, serve ad assicurare una prevalenza del segnale inibitorio su quello attivatorio, nel caso in cui la singola cellula co-esprima i due tipi di recettori (figura 4).

In particolare, se la cellula NK esprime contemporaneamente recettori attivatori e inibitori con specificità diversa per le molecole HLA di classe I, i KIR attivatori entrerebbero in funzione solo dopo che la cellula bersaglio abbia perso in maniera selettiva tutti gli alleli HLA riconosciuti dai KIR inibitori. Questo meccanismo è stato già dimostrato in alcuni tumori o infezioni virali²⁹. Il segnale attivatorio può risultare predominante anche nel caso in cui i recettori attivatori siano sovraespressi, coprendo di conseguenza il segnale inibitorio.

Numerosi studi concorrono a suffragare l'ipotesi che i KIR attivatori abbiano la capacità di riconoscere peptidi "non-self" o "inusuali", ricoprendo un possibile ruolo nel riconoscimento di cellule estranee o trasformate.

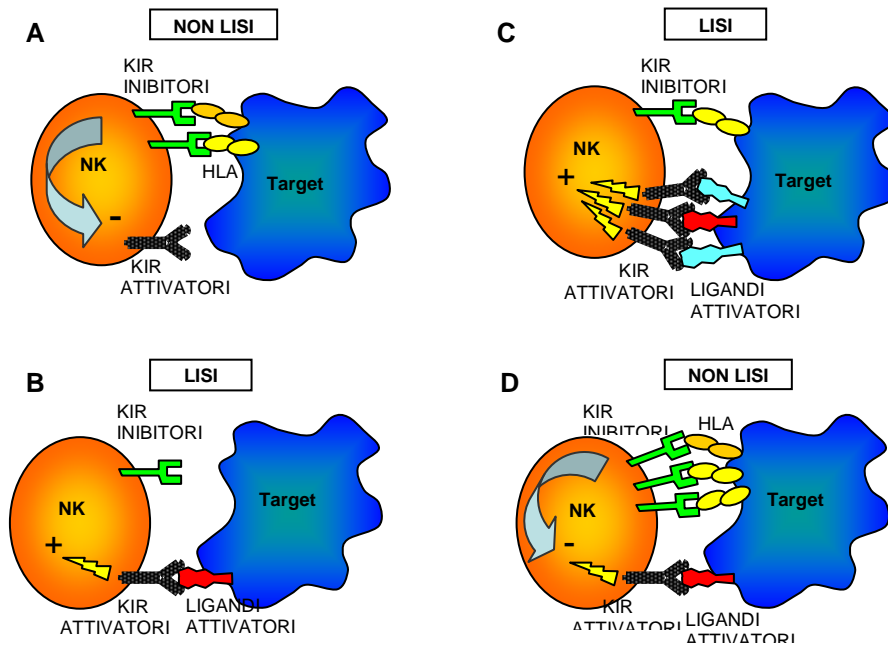


Figura 4. Regolazione dell'attività delle cellule NK attraverso i recettori KIR di tipo attivatorio e di tipo inibitorio. I KIR inibitori riconoscono come ligandi le molecole MHC di classe I (HLA) sulla superficie delle cellule e trasmettono un segnale di inibizione dell'attività citolitica delle cellule NK. I KIR attivatori in seguito al riconoscimento dei propri ligandi, mediano un segnale attivatorio che innesca l'azione citolitica delle cellule NK. A) Quando i recettori inibitori legano gli HLA, in assenza dell'interazione tra il recettore attivatorio e il proprio ligando, è generato un netto segnale negativo che blocca l'azione citolitica contro la cellula bersaglio. B) Al contrario, l'impegno del recettore attivatorio in assenza dell'interazione tra i KIR inibitori e i propri ligandi genera un netto segnale d'attivazione che innesca la lisi della cellula bersaglio. C) In questo caso, le interazioni tra ligandi e KIR attivatori predominano sulla debole interazione tra ligando e KIR inibitore con il netto risultato dell'attivazione della cellula NK e la lisi della cellula *target*. Questa situazione si può verificare quando i recettori attivatori o i ligandi sono sovraespressi, oppure quando i *self*-ligandi MHC di classe I sono sottoespressi, evento caratteristico durante le infezioni o le trasformazioni tumorali. D) Qui, predominano le interazioni tra HLA e KIR inibitori che preservano la cellula *target* dalla lisi³.

La regione genomica dei KIR

I recettori KIR sono codificati da una famiglia di geni che mappano sul cromosoma 19 (19q13.4), in una regione chiamata *Leucocyte Receptor Complex* (LRC) (figura 5).

I geni e gli pseudogeni KIR ricadono tutti in una zona specifica della LRC e costituiscono una regione che può essere costituita da 8 a 14 loci, ordinati in maniera sequenziale lungo il cromosoma. Tale regione è estremamente variabile e allo stesso tempo altamente organizzata.

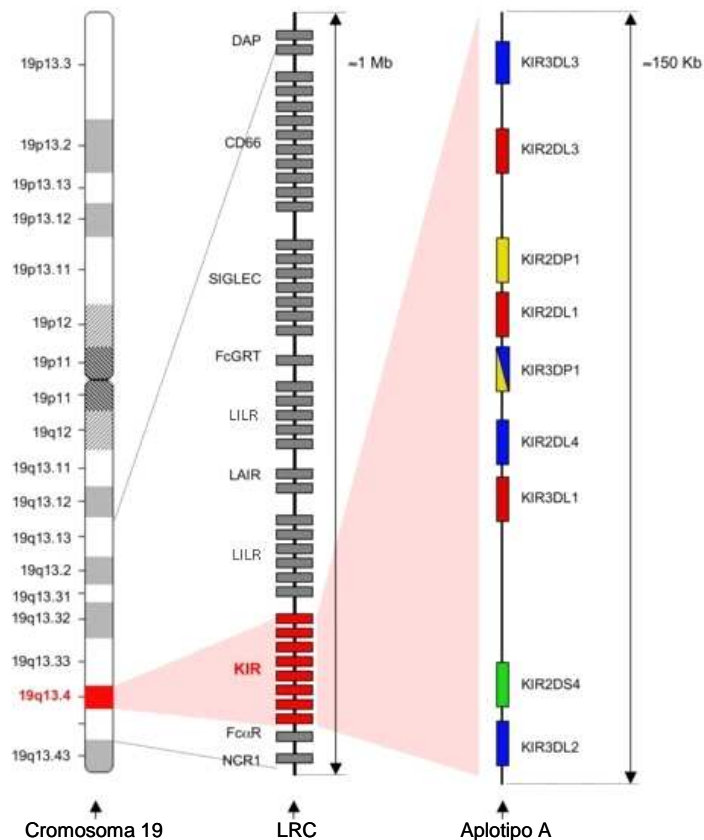


Figura 5. Organizzazione genomica del complesso dei recettori leucocitari (LRC) ed un aplotipo KIR.

La LRC è una regione con una struttura estremamente ordinata, con la presenza, in tutti gli aplotipi, di tre geni ed uno pseudogene (KIR3DP1), situati sempre nelle medesime posizioni: KIR3DL3 è situato sempre all'estremità centromerica, 3DP1 e 2DL4 al centro e 3DL3 all'estremità telomerica³⁰.

In questa regione anche la distanza tra un gene e l'altro è costante e misura 2,4 kb, ad eccezione dello spazio che separa i geni centrali che misura approssimativamente 14 kb.

Questa regione, inoltre, si caratterizza per un'ampia variabilità aplotipica tra individuo e individuo, che riguarda sia il contenuto genico, sia il numero dei geni presenti³¹. Il fattore che maggiormente contribuisce alla variabilità della regione è costituito dal polimorfismo dei geni KIR, che presentano alleli multipli conosciuti e, presumibilmente, altri ancora non identificati per ciascun locus^{30,31}. Il vantaggio di tale variabilità è, probabilmente, la diversificazione della risposta immunitaria, in un contesto di patogeni a rapido cambiamento.

Sui genotipi KIR sono stati fatti diversi studi di popolazione che hanno dimostrato l'eterogeneità del repertorio genico KIR da individuo a individuo. Sulla base di questi studi sono emersi 2 gruppi di aplotipi KIR maggiormente frequenti, l'aplotipo A e l'aplotipo B³².

Aplotipo A

L'aplotipo A è composto, dall'estremità centromerica a quella telomerica, dai seguenti geni KIR3DL3, 2DL3, 2DL1, 2DL4, 3DL1, 2DS4 e 3DL2 (figura 6).

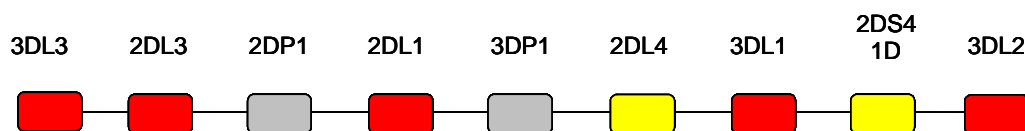


Figura 6. Rappresentazione schematica dell'aplotipo di gruppo A. Ogni casella rappresenta un gene KIR, il cui nome è riportato sopra. Le caselle in rosso sono i geni codificanti KIR inibitori e quelle in giallo rappresentano i KIR attivatori presenti (KIR2DS4, la sua variante deleta KIR1D e KIR2DL4). Le caselle in grigio rappresentano gli pseudogeni (2DP1, 3DP1).

In diversi studi di popolazione condotti finora, mediante l'analisi del contenuto genico KIR, si è identificata un'alta percentuale di individui omozigoti per l'aplotipo A, stimata nella popolazione caucasica tra il 30 e il 40%, mentre la frequenza aplotipica è circa del 50%^{32,33}. Da sottolineare che tale frequenza è diversa in relazione alla popolazione etnica che si va a considerare.

La caratteristica peculiare dell'aplotipo A è il possesso di un unico gene che codifica un KIR attivatorio sui 7 che lo compongono, il KIR2DS4. È stato anche dimostrato che la tipizzazione tradizionale per il gene KIR2DS4 non è capace di discriminare il gene intero da una sua variante comune, identica a 2DS4 ad eccezione di una delezione di 22 paia di basi nella sequenza codificante il dominio immunoglobulinico extracellulare³⁰. La delezione causa una interruzione nella traduzione e la prematura terminazione a livello del dominio transmembrana. Questa variante del gene 2DS4 è stata chiamata KIR1D³⁴. La funzione di KIR1D è sconosciuta, ma la struttura proteica a cui corrisponde implica che probabilmente non svolga le stesse funzioni del recettore attivatorio intero. Con l'identificazione di KIR1D l'aplotipo A può essere diviso in 2 aplotipi, l'aplotipo A-1D e l'aplotipo A-2DS4, il primo ricorre con una frequenza del 38% nella popolazione caucasica e il secondo ad una frequenza dell'11,8%. L'identificazione dell'aplotipo A-1D ha richiamato su di sé molto interesse, perché indica che l'aplotipo più frequente nella popolazione caucasica manca di tutti i recettori KIR attivatori funzionali. L'unico recettore con funzione attivatoria, in questo aplotipo, rimane il gene strutturalmente centrale KIR2DL4, data la sua abilità, come spiegato precedentemente, di mediare un segnale attivatorio oltre a quello inibitorio^{35,36}.

Aplotipo B

Mentre l'aplotipo di gruppo A è unico e ha KIR2DS4 come suo unico gene codificante un KIR attivatorio, l'aplotipo B è rappresentato da un gruppo di molteplici combinazioni geniche, caratterizzate dalla presenza di più geni di tipo attivatorio, che possono essere esibiti in diverse combinazioni e il cui numero va da 1 a 5. Il numero di geni inibitori è generalmente più alto, ma è mediamente simile in tutti gli individui. Sono infatti i geni attivatori a contribuire maggiormente alla variabilità del profilo aplotipico. Ciascun gene che caratterizza l'aplotipo A è ritrovabile anche nell'aplotipo B, ma non necessariamente (figura 7).

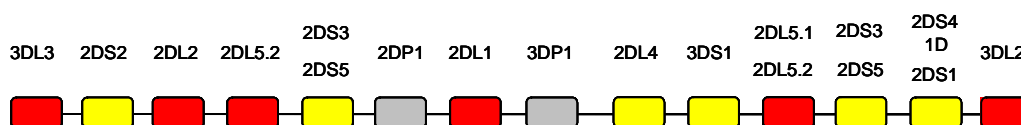


Figura 7. Rappresentazione schematica di un aplotipo B con tutti i possibili geni che lo possono comporre. Ogni casella rappresenta un locus e sopra vi è segnato il nome dei KIR che lo possono occupare. In rosso sono rappresentati i loci occupati da KIR inibitori, in giallo quelli occupati da KIR attivatori, in grigio quelli occupati da pseudogeni (2DP1, 3DP1).

La frequenza nella popolazione caucasica dell'aplotipo B è simile a quella dell'aplotipo A (50%) mentre la presenza di omozigosi per l'aplotipo B non è stimata, in quanto rappresentata da molteplici genotipi. Esiste, infatti, un numero molto alto di diversi genotipi omozigoti per l'aplotipo B ed eterozigoti AB.

Tra i geni annoverati nell'aplotipo B è di recente definizione KIR2DL5, presente in diversi sottotipi, distinti in varianti espresse (KIR2DL5.1) e varianti non espresse (KIR2DL5.2)³⁷. La particolarità di questo gene è che queste due varianti, pur essendo alleli tra loro, non si comportano necessariamente come tali. Ci si aspetterebbe, infatti, che l'una o l'altra variante occupi lo stesso locus, mentre sono state invece trovate contemporaneamente entrambe le varianti nello stesso aplotipo in due posizioni differenti. La loro presenza fa sì che esista la possibilità di avere fino a 14 differenti loci KIR in un unico aplotipo.

Polimorfismo allelico dei geni KIR

La caratteristica che maggiormente contribuisce alla variabilità della regione genomica KIR è certamente il suo polimorfismo genetico, che è dovuto principalmente a due meccanismi: le mutazioni puntiformi e la ricombinazione omologa³¹. Tale polimorfismo ricorda quello della regione genica MHC, anche se risulta essere di entità minore, a causa, presumibilmente, del numero limitato di geni KIR conosciuti.

A dimostrazione dell'elevato polimorfismo allelico di questa regione, studi di genotipizzazione hanno distinto, in soli quattro loci (KIR2DL1, 2DL3, 3DL1 e 3DL2), 22 differenti aplotipi A, evidenziando come meno dello 0,24% degli individui non legati da parentela possa possedere un identico genotipo³¹. Da sottolineare che la diversità negli aplotipi di gruppo A è soprattutto a livello allelico, mentre gli aplotipi di gruppo B variano molto nel contenuto genico, manifestando, invece, moderato polimorfismo allelico³⁸.

Un elevato grado di polimorfismo è stato recentemente evidenziato per il locus genico del KIR3DL1. Questo recettore e il suo corrispettivo attivatorio KIR3DS1 venivano inizialmente considerati come due geni distinti. Si è invece scoperto, mediante analisi di segregazione, che essi segregano come alleli dello stesso locus genico³⁹. Complessivamente sono stati identificati 22 alleli, di cui 17 (*00101, *00102, *002, *00401, *00402, *005, *006, *007, *008, *009, *01501, *01502, *016, *017, *018, *019 e *020) codificano il recettore inibitorio KIR3DL1 ed i rimanenti 5 (*010, *011, *012, *013 e *014) l'attivatorio KIR3DS1 (www.ebi.ac.uk/ipd/kir/). Questi due recettori posseggono un'omologia di sequenza pari al 97%, ma differiscono notevolmente per quanto riguarda il dominio intracitoplasmatico. Il KIR3DS1 infatti, possiede un dominio intracitoplasmatico corto, tipico dei recettori attivatori, mentre il KIR3DL1 ha una coda intracitoplasmatica lunga, che media un segnale di tipo inibitorio. E' stato finora dimostrato che KIR3DL1 ha una specificità di legame per HLA-Bw4, mentre il ligando di KIR3DS1 non è stato ancora identificato. Poiché la sequenza che codifica per la porzione extracitoplasmatica di questi due recettori è omologa, si può ipotizzare che essi riconoscano lo stesso ligando. Gli studi finora condotti non hanno ancora confermato, per il KIR3DS1, tale specificità e una delle ipotesi più accreditate suppone che il meccanismo di riconoscimento dell'HLA specifico necessiti di fattori addizionali, come, ad esempio, la presenza di particolari peptidi associati non covalentemente all'HLA-Bw4⁴⁰.

La regolazione dell'espressione dei KIR

Affinché non vi siano cellule NK con una marcata tendenza ad essere inibite o, viceversa, attivate è fondamentale che il numero ed il tipo di recettori KIR inibitori ed attivatori espressi siano finemente controllati. La selezione dei recettori avviene secondo un meccanismo stocastico e questo fa sì che all'interno della popolazione NK di un individuo ogni clone riconosca un diverso repertorio di molecole HLA⁴¹.

Il meccanismo molecolare che controlla l'espressione cellulo-specifica dei recettori è senza dubbio molto complesso, tuttavia è stato dimostrato che la metilazione del DNA svolge

un ruolo importante nel mantenere il *pattern* di espressione dei KIR nell'ambito di ogni clone NK^{27,42}. Più di 25 anni fa, due gruppi di ricercatori ipotizzarono che tale meccanismo epigenetico fosse responsabile dell'espressione tessuto-specifica dei geni^{43,44}. Successivamente è stato dimostrato che, nei mammiferi, la metilazione interessa le citosine delle isole CpG, localizzate principalmente nel promotore e nella regione 5' dei geni. Un elevato grado di metilazione corrisponde all'assenza o ad un basso livello di trascrizione e questa correlazione è stata riscontrata nei geni del cromosoma X non trascritto, nei geni soggetti all'*imprinting*, nei geni transfettati e nei transgeni²⁷.

Ad eccezione del KIR2DL4, che viene espresso da tutte le cellule NK, gli altri geni KIR sono espressi da una frazione ristretta della popolazione NK, con modalità clonale²⁶. In cellule NK purificate da sangue periferico di donatori sani, l'analisi del promotore dei geni KIR non espressi ha evidenziato un'elevata frequenza di metilazione delle isole CpG. Nelle stesse cellule successivamente trattate con 5-aza-2'-deossicitidina, un inibitore delle DNA metiltransferasi (DNMT), è stata riscontrata l'espressione di quei geni KIR originariamente silenziati ed una consistente demetilazione dei loro promotori. Le DNMT, ovvero gli enzimi che catalizzano la metilazione del DNA, comprendono tre isoforme tra le quali DNMT1, che assicura il mantenimento del *pattern* di metilazione durante la replicazione, rappresenta quella maggiormente espressa²⁶. Nel loro insieme, questi risultati dimostrano che vi è una correlazione diretta tra la metilazione del promotore ed il silenziamento del gene KIR^{27,42}.

La metilazione non è però l'unico meccanismo epigenetico responsabile del controllo dell'espressione dei geni; è stato, infatti, dimostrato che l'acetilazione degli istoni H3 ed H4, a livello di determinati residui aminoacidici, svolge un ruolo altrettanto importante. Inoltre, questi due meccanismi interagiscono tra loro in modo inverso e si suppone che operino in modo sequenziale. L'acetilazione degli istoni e la demetilazione del promotore sono correlate all'espressione del gene, mentre, al contrario, la deacetilazione degli istoni e la metilazione del promotore si accompagnano al silenziamento genico.

Ipotizzando che l'acetilazione degli istoni abbia la stessa importanza della metilazione del DNA nel regolare l'espressione dei geni KIR, il *cluster* KIR potrebbe trovarsi in una conformazione eucromatinica con gli istoni H3 ed H4 acetilati e gli alleli KIR espressi sarebbero solamente quelli il cui promotore risulta ipometilato²⁸. Gli studi condotti recentemente su cellule NK trattate con tricostatina (TSA), un inibitore delle deacetilasi istoniche, non sembrano avvalorare tale ipotesi: in queste cellule non si nota, infatti, un significativo aumento dell'espressione dei geni KIR, al contrario di quello che accade nelle stesse cellule trattate con l'inibitore delle DNMT. Complessivamente, questi risultati

dimostrano che, nel caso delle cellule NK, la metilazione del DNA è il principale meccanismo che regola la trascrizione dei geni KIR⁴⁵.

LA CASCATA MOLECOLARE JAK/STAT

Le citochine e i fattori di crescita regolano numerosi processi biologici attraverso la loro interazione con i recettori legati alla membrana cellulare. A dispetto del numero e della diversità di citochine e di fattori di crescita esistenti, le cascate di segnale sono altamente conservate. Una delle più importanti coinvolge la famiglia delle tirosin chinasi Janus (JAK) e delle proteine trasduttrici di segnale e attivatrici di trascrizione (STAT). Finora sono state identificate 4 diverse JAK e 7 STAT, che tramite le loro diverse combinazioni mediano il segnale di più di 40 citochine⁴⁶. Le citochine che utilizzano questo *pathway* si legano al loro recettore citochinico che, mancando di attività chinasi propria, sfrutta la tirosin chinasi JAK associata alla sua porzione intracitoplasmatica. Il legame tra ligando e recettore induce la dimerizzazione del complesso recettoriale che risulta in una giustapposizione delle JAK e nella loro *cross*-fosforilazione. Le JAK attivate fosforilano a loro volta le porzioni citoplasmatiche dei recettori citochinici reclutando e fosforilando le STAT. Le STAT, una volta fosforilate, formano un dimero o tetramero attivato che trasloca nel nucleo cellulare dove si lega a specifiche sequenze di DNA andando ad attivare l'espressione dei geni bersaglio (figura 8). I geni *target* di questa cascata sono geni deputati alla regolazione di crescita, differenziazione, proliferazione, sopravvivenza e apoptosi cellulare. La trasduzione del segnale citochinico deve essere, quindi, finemente controllata per evitare un'eccessiva stimolazione. Tra i diversi meccanismi deputati a questo ruolo, uno dei principali è quello mediato dalla famiglia dei soppressori del segnale citochinico, le proteine SOCS. Queste proteine sono sintetizzate in seguito alla stimolazione citochinica del *pathway* JAK/STAT e le stesse proteine SOCS estinguono il segnale che ha stimolato la loro produzione, agendo in un classico *loop a feedback* negativo^{47,48}.

Proprio per il ruolo critico delle STAT nel regolare la crescita cellulare e la proliferazione, una qualsiasi deregolazione di questo *pathway* può portare ad un'attivazione inappropriata di STAT ed ad un suo conseguente comportamento da oncogene. Difatti, vi sono diversi lavori di letteratura che descrivono STAT implicata in molte forme tumorali solide ed ematologiche. Nel particolare, l'attivazione costitutiva di STAT3 è stata ritrovata coinvolta nella leucemia acuta e cronica, dimostrando che l'alterazione della cascata di segnale JAK/STAT può essere cruciale nello sviluppo tumorale delle cellule

ematopoietiche^{49,50}. Il dato interessante è che l'alterazione di questo *pathway* è stata descritta anche nella T-LDGL nei lavori di E. Burnette e di Shade, che riscontrano nei pazienti affetti la presenza di STAT3 costitutivamente attivata e *over-espressa*^{20,51}.

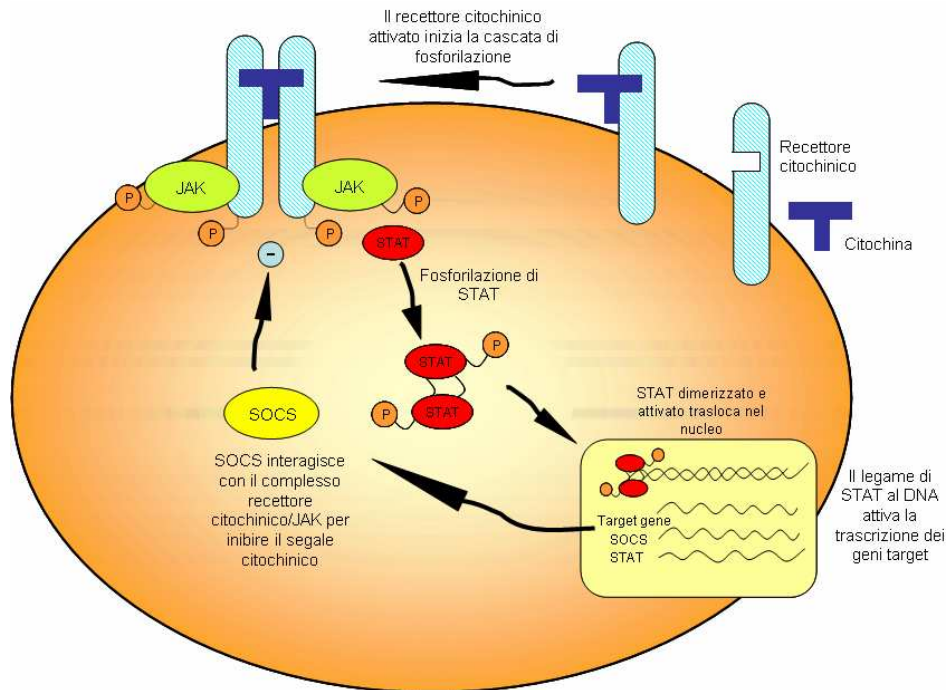


Figura 8. Rappresentazione della cascata molecolare JAK/STAT. L'interazione recettore-citochina risulta nella formazione di un complesso recettoriale dimerizzato e attivato. Tale complesso coinvolge l'associazione di JAK che *cross*-fosforila e fosforila il recettore citochinico. Segue il reclutamento di STAT che viene fosforilato. STAT attivato dimerizza quindi trasloca nel nucleo dove induce la trascrizione di diversi geni, tra cui STAT stesso, SOCS e altri geni regolanti la crescita cellulare.

La proteina SOCS3

SOCS è una famiglia di regolatori a feedback negativo, indotti da segnali citochinici. La famiglia comprende 8 membri caratterizzati dalla presenza di un dominio SH2 (Src Homology 2), richiesto per interagire con i residui fosfotirosinici bersaglio, un dominio N-terminale di variabile lunghezza non sempre presente e la cui funzione rimane sconosciuta e un dominio carbossi-terminale conservato chiamato SOX box, che si pensa sia coinvolto nel *targeting* proteosomico⁵². Gli effetti inibitori delle proteine SOCS derivano dalla diretta interazione con i recettori citochinici o con le JAK, impedendo così il reclutamento di STAT. Le proteine SOCS regolano il loro stesso *turn-over* marcando le proteine per la poliubiquitinazione e la degradazione proteosoma-mediata⁴⁸.

Nella famiglia di SOCS, SOCS3 è stata molto studiata per il suo coinvolgimento nello sviluppo delle cellule T: essa è costitutivamente espressa a bassi livelli nelle cellule T *naive* e

differentemente regolata nelle cellule T attivate. Diversi dati attestano che, a questo proposito, il grado di inibizione dei livelli di mRNA di SOCS3 è inversamente proporzionale ai livelli di proliferazione delle cellule T e che SOCS3 può funzionare in concerto con altre proteine per mantenere lo stato quiescente nei linfociti e l'inibizione transiente della sua espressione può essere essenziale per permettere alle cellule quiescenti di rispondere a segnali di crescita e proliferazione⁵³. Tra le citochine e gli stimoli che inducono SOCS3, le principali sono l'IL-6, l'ormone della crescita, l'eritropoietina, la leptina, la leukemia-inhibitory factor e la lipopolisaccaride⁵⁴⁻⁵⁷. Siccome SOCS3 media il suo effetto inibitorio legandosi al recettore specifico per le citochine che attivano STAT3, come quelle sopracitate, l'effetto soppressivo di SOCS3 è stato dimostrato essere relativamente ristretto a STAT3. Questa stretta correlazione è stata provata anche da studi condotti su topi privati di SOCS3 che manifestano come diretta conseguenza STAT3 iperattivata⁵⁸. Inoltre, l'interesse per questa proteina, tra le altre della sua famiglia, è nato dal suo coinvolgimento in diverse forme ematologiche, quali la leucemia mieloide cronica e acuta (CML e AML)^{50,59}, in cui invece di comportarsi da oncosoppressore, svolgendo la sua funzione inibitoria contro STAT3, muta la sua funzione ad oncogene. Non vi sono attualmente dati sul ruolo di SOCS 3 nella LDGL.

LE DC NELLA LDGL

Le DC sono cellule specializzate, tra le più importanti cellule presentanti l'antigene (APC), capaci di indurre l'attivazione delle cellule T e, secondo recenti dati di letteratura, coinvolte anche nell'attivazione delle cellule NK^{60,61}. Esse vanno incontro a maturazione a seguito dell'esposizione a microorganismi di cui catturano gli antigeni, tramite una regolata endocitosi e fagocitosi. Le DC si dividono in due distinti sottogruppi: le DC mieloidi (mDC) CD11c+ BDCA1+ e quelle plasmocitoidi (pDC) CD11c- BDCA2+ (CD303+), le prime secernono IL-12p70 e vengono attivate in risposta ai patogeni microbici o all'interferone gamma (IFN γ), le seconde secernono alti livelli di interferone di tipo I (IFN-I) in risposta a virus. Dipendentemente dal microambiente in cui si trovano, entrambi i sottogruppi sono capaci di indurre diversi tipi di risposta immunitaria sia innata che adattativa.

Sebbene un loro diretto coinvolgimento non sia mai stato dimostrato, si ritiene che le DC giochino un ruolo in diverse fasi della LDGL. Nell'innesco della malattia si ipotizza che i GL stabiliscano un contatto con le DC che presentano il *target* specifico, infatti le cellule patologiche proliferanti appartengono all'arma citotossica della risposta immunitaria^{12,62,63}. A conferma di questa ipotesi, per quanto la natura esatta del *target* rimanga tuttora sconosciuta, la relazione con le infezioni virali come evento iniziale della LDGL è stata ipotizzata da

diversi gruppi⁶⁴⁻⁶⁷. Un'altra fase cruciale della LDGL in cui potrebbero intervenire le DC, è quella del mantenimento della proliferazione dei GL, infatti, diverse citochine, quali l'IL-2, l'IL-12, l'IL-15 e l'IL-18, definite avere un ruolo cruciale nello stimolare il clone patologico in espansione, sono abbondantemente espresse dalle DC^{1,22,68}. A ulteriore sostegno di un ruolo delle DC in questa patologia, nel nostro gruppo è stato precedentemente provato che, in vitro, i GL da NK-LDGL proliferano in presenza delle DC autologhe e allogene derivate da SP, anche se, inversamente, lo stesso effetto non è stato evidenziato nella T-LDGL²¹. Tuttavia, hanno rilevato che le DC autologhe ottenute da midollo osseo manifestano un effetto stimolatorio verso la proliferazione dei GL in entrambe le forme di malattia. Da analisi di biopsie ossee, inoltre, si è osservata una precisa distribuzione topografica delle DC e dei GL che indicava lo stretto contatto tra i 2 tipi cellulari nel midollo osseo, una colocalizzazione riscontrata solo nei pazienti con LDGL e mai negli individui normali (figura 9). Tutti questi dati comprovano che siano le DC a presentare l'antigene specifico capace di innescare la malattia a seguito del contatto con i GL e aggiungono l'importante informazione che questo avvenga in modo specifico a livello del midollo osseo. Inoltre, visto l'andamento della malattia e i dati finora conseguiti, si può ipotizzare che siano le DC a stimolare i GL a proliferare in modo protratto nel tempo come se si instaurasse una risposta immunitaria che non trova risoluzione finale, bensì rimane continuamente sollecitata.

Inoltre, è da sottolineare che nel *cross-talk* tra DC e GL si svolgono interazioni multidirezionali, non solo le DC influenzano il destino dei GL, ma a loro volta i GL sono in grado di controllare, far maturare o uccidere le DC in base ai segnali citochinici di scambio. Questo meccanismo è stato preso in esame anche all'interno della NK-LDGL da un recente lavoro di Vitale che studia le reciproche influenze tra DC e GL-CD3- (dati non pubblicati).

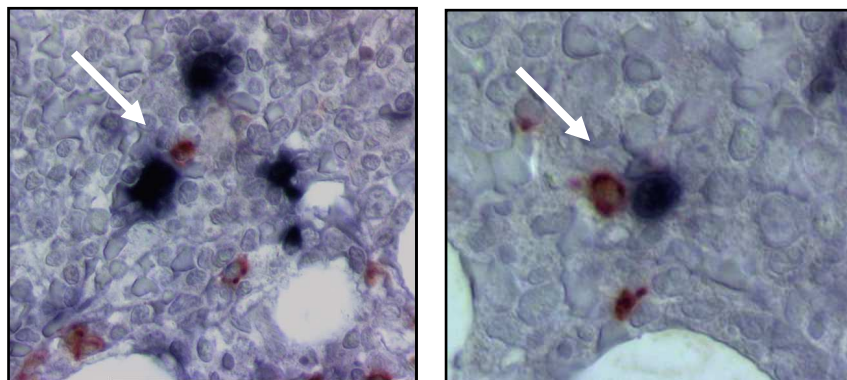


Figura 9. Immagini al microscopio di immunostochimica rappresentanti sezioni di biopsie del midollo osseo di pazienti con LDGL, in nero sono colorate le DC, in rosso i GL. Le frecce bianche indicano i due tipi cellulari in contatto, peculiarità riscontrata in molti pazienti e mai nei controlli normali.

La chemochina CXCL16

Tra le molecole coinvolte nel *cross-talk* tra DC e GL, in questa tesi, abbiamo preso in esame CXCL16, espressa sulle DC, e il suo recettore CXCR6, espresso sui GL.

CXCL16 è stata recentemente caratterizzata, unica chemochina nella sua capacità di esistere in due forme distinte, quella transmembrana e quella solubile, ciascuna capace di adempiere a diverse funzioni. CXCL16 è un piccolo polipeptide chemotattico della famiglia delle chemochine. Essa è sintetizzata come molecola di membrana, ma può essere clivata sulla superficie cellulare e produrre una proteina chemotattica solubile ad opera della disintegrina e metallo-proteasi ADAM-10, azione eventualmente amplificata dall'enzima strettamente correlato ADAM-17⁶⁹.

Strutturalmente la sua forma transmembrana è costituita da più domini: nella porzione *extra*-citoplasmatica vi è un dominio chemochinico e un gambo flessibile mucino-simile altamente O-glicosilato, quindi segue un dominio transmembrana ed, infine, una piccola coda citoplasmatica contenente i potenziali siti di legame alle proteine SH2 (figura 10). La forma solubile di CXCL16, invece, è costituita solo dal dominio chemochinico e gran parte del gambo extracellulare. Il fatto di essere l'unica della sua famiglia, insieme alla fractalchina⁷⁰, a possedere anche una forma transmembrana la rende speciale e di particolare interesse, tutte le altre chemochine conosciute, infatti, esistono solo nella forma secreta.

CXCL16 è espressa sia sulle mDC che sulle pDC, come espressione costitutiva è maggiormente presente sulle prime che nelle seconde, dove i valori transmembrana sono più bassi a favore di una maggiore quantità di proteina solubile. L'espressione di CXCL16 basale è *up*-regolata dai mediatori dell'infiammazione che inducono le DC a diventare potenti cellule presentanti l'antigene⁷¹.

Funzionalmente questa chemochina appare esercitare attività omeostatiche e infiammatorie, nella sua forma legata alla membrana si comporta da recettore endocitico e molecola di adesione e nella sua forma solubile diventa una chemochina capace di attrarre le cellule T CD4+ e CD8+ attivate e quelle NKT^{69,71,72}. Il fatto che la sua forma solubile sia stata riscontrata ad alti livelli nel siero sotto diverse condizioni infiammatorie, in particolare nel fluido sinoviale di pazienti con artrite reumatoide⁷³ e nei BAL di pazienti con sarcoidosi polmonare⁷⁴, indica che il clivaggio della chemochina transmembrana è associato con la cascata infiammatoria e, quindi, si ritiene che la forma solubile possa servire come *marker* di infiammazione. Da studi *in vitro*, inoltre, è stato riportato che CXCL16 non si limiti al reclutamento leucocitario, è stata infatti ritrovata indurre la produzione di citochine e la

proliferazione cellulare nelle cellule vascolari e nelle cellule muscolari lisce (SMC)⁷⁵, infine, è stata dimostrata anche una sua attività pro-angiogenica sulle cellule endoteliali⁶⁹.

Il recettore di CXCL16 è CXCR6 (chiamato anche Bonzo, TYMSTR o STRL33). Esso è stato inizialmente scoperto come co-recettore per il virus umano d'immunodeficienza (HIV)^{76,77}, è espresso da sottogruppi di linfociti Th1 o T citotossici di tipo 1 (Tc1), cellule NK/T, SMC, cellule plasmatiche del midollo osseo e cellule di mieloma^{72,78,79} e la sua espressione sulle cellule T *naive* è incrementata dall'incontro con le DC. L'interazione tra CXCL16 e CXCR6 conduce ad un'adesione cellula-cellula molto resistente, al contrario, il clivaggio conduce alla *down*-regolazione delle proprietà adesive e può risultare anche nel distacco delle cellule legate. Anche CXCR6, come il suo ligando, è presente nei siti di infiammazione, è responsabile dell'infiltrazione leucocitaria in tessuti non-linfatici ed è stato ritrovato caratterizzare le cellule T presenti nell'artrite reumatoide e in diversi tipi di tumore⁸⁰.

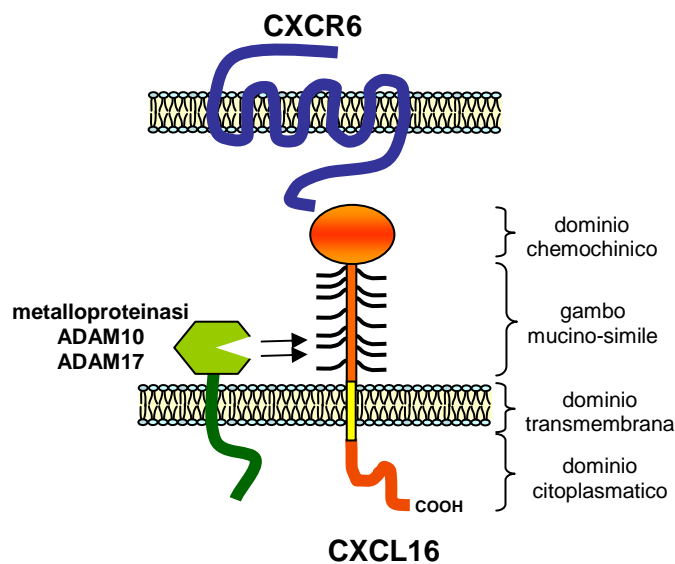


Figura 10. Rappresentazione schematica di CXCL16 in forma transmembrana, a destra sono indicati i suoi domini, a sinistra è rappresentato l'enzima ADAM10 o ADAM17 che genera la forma solubile di CXCL16, al di sopra c'è il suo recettore specifico, CXCR6.

SCOPO DELLA TESI

Questo progetto di ricerca ha sviluppato diverse linee di indagine su entrambe le forme di LDGL, T ed NK, per studiare molecole e meccanismi coinvolti nell'innescamento e mantenimento della patologia.

Alla luce della scoperta che GL esprimono in prevalenza KIR attivatori sono preferenzialmente selezionati nei pazienti con NK-LDGL a costituire il clone in espansione, un primo scopo del nostro studio è stato quello di approfondire che ruolo abbiano i geni KIR in questa forma di patologia, se vi sia nei pazienti un'aumentata presenza di geni KIR attivatori rispetto ai controlli sani e se esista un genotipo KIR che predisponga allo sviluppo della malattia.

Il riconoscimento dell'effettiva importanza dei geni attivatori, insieme alla precedente scoperta della tendenza dei pazienti ad esprimere il recettore attivatorio KIR3DS1 rispetto al corrispondente inibitorio KIR3DL1, ci hanno successivamente indotto ad indagare su questa coppia di recettori. La nostra attenzione si è focalizzata, inizialmente, sulla valutazione della loro espressione genica e, successivamente, sul possibile coinvolgimento del meccanismo epigenetico che regola l'espressione dei KIR.

Per quanto riguarda la forma T della LDGL, invece, abbiamo posto la nostra attenzione sul *pathway* JAK/STAT. Secondo dati di letteratura questa cascata di segnale è alterata nella T-LDGL per una *over*-espressione di STAT3 in forma attivata. Il nostro obiettivo è stato quindi quello di valutare e analizzare la proteina SOCS3, deputata a inibire e bloccare il segnale di STAT3.

Come ultimo obiettivo, abbiamo studiato in entrambe le forme di LDGL due chemochine che potrebbero essere coinvolte nel *cross-talk* tra DC e GL, "dialogo" ipotizzato cruciale nello sviluppo della malattia. Abbiamo quindi analizzato il ligando CXCL16, espresso dalle DC, e il suo recettore specifico CXCR6, espresso dai GL. Con questo scopo siamo andati a valutare la loro espressione sui rispettivi tipi cellulari, la loro presenza nella sinapsi immunitaria tra DC e GL, la localizzazione di CXCR6 nei *lipid rafts* e, infine, la capacità di CXCL16 in forma solubile di influenzare la vitalità dei GL.

Tutte le analisi sono state eseguite mediante l'utilizzo di tecniche di citofluorimetria, di biologia cellulare e molecolare e di microscopia confocale e i dati raccolti dai pazienti sono stati confrontati con quelli raccolti da un gruppo di controlli.

MATERIALI E METODI

PAZIENTI E CONTROLLI

In questa tesi sono stati studiati pazienti affetti da LDGL di tipo T ed NK. La diagnosi di malattia è stata posta in accordo con i criteri riportati in precedenza⁹. In tutti i casi era dimostrabile nel sangue periferico una linfocitosi cronica, protratta per almeno 6 mesi e sostenuta da almeno 2.000 GL/mm³. In ciascun paziente la proliferazione linfocitaria era rappresentata da una percentuale di GL compresa tra il 40 e l'85%. Al momento dello studio nessun paziente era sottoposto a terapia specifica. Tutte le analisi sono state condotte anche su individui sani rappresentativi della popolazione normale.

SEPARAZIONE DEI LINFOCITI DA SANGUE PERIFERICO

Le cellule mononucleate (linfociti e monociti) del sangue periferico ottenute dai pazienti affetti da LDGL e dagli individui sani, sono state isolate attraverso stratificazione su Ficoll/Hypaque (F/H) (figura 11). Tale metodo sfrutta la diversa densità delle cellule mononucleate rispetto agli altri elementi del sangue. Infatti, linfociti, monociti e piastrine, avendo una densità minore, si concentrano sopra lo strato di F/H; al contrario i globuli rossi (RBC) ed i granulociti, caratterizzati da una maggiore densità rispetto al F/H, si raccolgono sul fondo della provetta (figura 11). Il sangue periferico viene prima diluito 1:3 con una soluzione sterile di sodio cloruro 0,9% (soluzione fisiologica) a temperatura ambiente ed agitato delicatamente; in seguito viene stratificato lentamente sopra la soluzione di F/H. Si procede quindi con una centrifugazione a 900g per 20 minuti a 20°C, senza freno, e successivamente si preleva l'anello di cellule mononucleate formatosi all'interfaccia con il F/H. Queste ultime vengono sottoposte a due lavaggi successivi con soluzione fisiologica per eliminare gli elementi contaminanti (piastrine), centrifugate a 400g per 10 minuti con freno ed infine risospese in 1 ml di soluzione fisiologica. Le cellule ottenute vengono infine contate nella camera di Burker. Un'aliquota corrispondente a 10 milioni di cellule viene centrifugata a 400g per 10 min a 20°C con freno ed il fondello ottenuto viene conservato a -20°C per la successiva estrazione del DNA. I restanti milioni di cellule vengono lasciati in fisiologica perché siano successivamente analizzati al citofluorimetro e purificati tramite *sorting*.

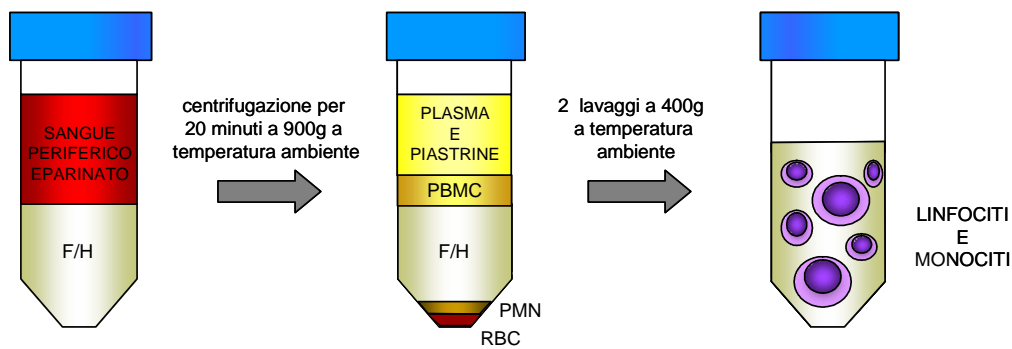


Figura 11. Separazione delle cellule mononucleate dal sangue periferico mediante stratificazione su Ficoll-Hypaque (F/H). PBMC: cellule mononucleate del sangue periferico; PMN: cellule polimorfonucleate; RBC: globuli rossi.

ANALISI CITOFUORIMETRICA E SORTING DEI GL

Le cellule mononucleate ottenute dal sangue periferico dei pazienti e dei controlli normali sono state caratterizzate mediante analisi citofluorimetrica utilizzando anticorpi monoclonali (AcMo) diretti verso linfociti T e cellule NK. Per l'analisi è stato impiegato il citofluorimetro FACSCalibur (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA) ed i dati sono stati processati usando il programma CELLQuest (Becton Dickinson). Per la caratterizzazione di ogni campione cellulare sono stati acquisiti almeno 1×10^4 eventi e l'analisi è stata condotta sovrapponendo gli istogrammi dei campioni ottenuti con i diversi anticorpi all'istogramma ottenuto con il controllo isotipico.

Gli AcMo impiegati in questo studio sono commercializzati dalla Becton Dickinson ed includono: l'anti-CD3, l'anti-CD16, l'anti-CD56, l'anti-CD57 per distinguere le popolazioni cellulari d'interesse, l'anti-CXCL16 e l'anti-CXCR6 ed i relativi controlli isotipici. Per i recettori delle cellule NK sono stati utilizzati AcMo purificati specifici: EB6 (IgG1 o CD158a) che riconosce KIR2DL1/2DS1; GL183 (IgG1 o CD158b) che lega KIR2DL2/2DL3 e KIR2DS2; FEST172 (IgG2a) che riconosce KIR2DS4; Z27 (IgG1) che lega KIR3DL1/3DS1 e Q66 (IgM) che riconosce KIR3DL2 (tabella 1).

Il processo di *sorting* (separazione) è stato utilizzato per purificare le cellule NK o i linfociti T dei pazienti e dei controlli sani. Una quantità di cellule mononucleate compresa tra 30 e 125×10^6 è stata incubata con un anticorpo coniugato con il fluorocromo FITC (isotiocianato di fluoresceina) e diluito in buffer salino fosfato (PBS), per 20 minuti a 4°C . Dipendentemente dal fenotipo cellulare della popolazione cellulare che si voleva isolare sono stati utilizzati diversi anticorpi: l'anticorpo anti-CD16 per isolare le cellule NK e i GL-CD3-

l'anticorpo anti-CD3 per isolare i Linfociti T e i GL-CD3+ o l'anticorpo anti-CD56 o CD57 se i GL patologici possedevano questi antigeni sulla loro superficie cellulare. Come controllo isotipico è stato utilizzato l'anticorpo IgG1 FITC-coniugato. Dopo la marcatura, le cellule sono state sottoposte a due lavaggi ed infine risospese in PBS-EDTA (etilendiamminotetraacetato). Le cellule marcate sono state isolate dalla popolazione cellulare totale mediante l'impiego del FACS Aria cell sorter (BD Biosciences, San Jose CA, USA), usando un filtro "passa banda" a 530 nm ed il laser ad argon (488 nm, 100 mW) per eccitare il fluorocromo FITC. Per ogni campione analizzato sono stati acquisiti 5.000 eventi/secondo. Le aliquote cellulari ottenute sono state infine analizzate per testarne la purezza e la vitalità, risultate sempre maggiori del 95%.

Le cellule ottenute dopo tale passaggio sono state suddivise in aliquote da 4 e 10 milioni per essere poi sottoposte rispettivamente all'estrazione dell'RNA totale e del DNA. Le aliquote da 4 milioni, ottenute dopo centrifugazione a 400g per 10 minuti, sono state risospese nel tampone di lisi del kit "*Rneasy Mini*" (QIAGEN, Hilden, Germany) addizionato di β -mercaptoetanololo 14,5M, e conservate a -80°C. Diversamente, le aliquote da 10 milioni sono state centrifugate a 400g per 10 min, ed il fondello ottenuto è stato conservato a -20°C.

PURIFICAZIONE DEI GL MEDIANTE BIGLIE IMMUNO-MAGNETICHE

Per alcuni esperimenti è stato utile selezionare i GL con un metodo diverso dal *sorting*, al fine di evitare di stimolare i GL legando i loro recettori di attivazione. E' stata quindi applicata una metodica che seleziona i GL dai PBMC in negativo, utilizzando anticorpi coniugati a microbiglie magnetiche e colonnine apposite (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

I PBMC ottenuti dalla separazione tramite F/H vengono centrifugati a 300g per 10 minuti, con freno, in modo da ottenere un fondello di cellule che viene risospeso in un tampone costituito da PBS e siero fetale di vitello (*fetal calf serum*, FCS, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) al 20% sterile. Si procede addizionando alla sospensione le biglie magnetiche coniugate con l'anticorpo monoclonale (AcMo) specifico (80 μ l di tampone e 20 μ l di biglie per 10^7 cellule). Per ottenere i GL-CD3+ viene fatta un'incubazione di 20 minuti a 4°C con biglie coniugate all'anticorpo anti-CD3, anti-CD14 e anti-CD19; per ottenere i GL-CD3- si utilizzano invece biglie coniugate all'anticorpo anti-CD4, anti-CD14 e anti-CD19. Al termine dell'incubazione viene effettuato un lavaggio nel tampone di purificazione a base di PBS 1X, BSA 0.5% (Bovine Serum Albumine), EDTA 2 mM e, a questo punto, le cellule

sono state fatte fluire in apposite colonnine per separazione, quindi sono state raccolte le cellule selezionate in negativo, poichè le positive che portano legato l'anticorpo coniugato con le biglie magnetiche vengono trattenute in colonna. L'eluato così ottenuto è stato lavato in PBS e i GL isolati sono stati contati ed utilizzati per i successivi esperimenti.

ANALISI MOLECOLARE

Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto da 10×10^6 cellule mononucleate o cellule NK ottenute da sangue periferico, utilizzando il kit Genomic DNA Purification (Gentra, MN, USA) che prevedeva i seguenti passaggi:

- Lisi delle cellule con l'aggiunta al campione di 3 ml di *Cell Lysis Solution*.
- Trattamento con RNasi: si aggiungono al lisato cellulare 15 µl di *RNase A Solution*, al fine di eliminare l'RNA presente nel campione e lo si incuba a 37°C per 15-60 minuti.
- Precipitazione proteica: il campione viene posto in ghiaccio per 3 minuti. Al lisato cellulare trattato con RNasi A viene aggiunto 1 ml di *Protein Precipitation Solution*. Si centrifuga quindi a 2.000g per 10 minuti. Le proteine precipitate formeranno un fondello ben adeso.
- Precipitazione del DNA: si trasferisce il sovrnatante contenente il DNA in una provetta contenente 3 ml di isopropanolo al 100%. Si miscelano i campioni invertendoli gentilmente per precipitare il DNA. Si centrifuga a 2.000g per 3 minuti. Il DNA dovrebbe essere visibile come un piccolo *pellet* bianco. Il sovrnatante viene quindi eliminato e si fa un lavaggio in di etanolo al 70%.
- Idratazione del DNA: Si aggiungono 100 µl di *DNA Hydration Solution* per reidratare il DNA. Il DNA viene conservato a 4°C. Per conservazioni a lungo termine, il DNA viene posto a -20°C o a -80°C.

La resa ottenuta è di 50-100 µg di DNA.

Il DNA estratto viene quindi quantificato tramite lettura allo spettrofotometro.

Per verificare la qualità del DNA ottenuto ne sono stati seminati 5 µl per ogni campione in un gel di agarosio allo 0,8% in tampone tris-acetato (TAE) 1X con bromuro di etidio al 5% v/v (da una soluzione madre di 10 mg/ml).

Estrazione dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto da 4×10^6 cellule NK o linfociti T ottenuti da sangue periferico utilizzando il protocollo del kit “*Rneasy Mini*” (QIAGEN, Hilden, Germany).

I linfociti sono stati lisati utilizzando una soluzione contenente β -mercaptoetanololo e tampone di lisi e successivamente processati tramite ripetute aspirazioni con ago da 20G. Dopo aggiunta di 350 μ l di etanolo al 70%, il campione è stato trasferito in una colonnina di purificazione (fornita dal *kit*) e poi centrifugato a 8.000g per 15 secondi, con successiva eliminazione dell'eluato. È stato eseguito, quindi, un lavaggio con 700 μ l di tampone RW1 e, dopo centrifugazione a 8.000g per 15 secondi, sono stati effettuati altri due lavaggi del materiale nella colonnina con 500 μ l di tampone RPE contenente etanolo. Per eluire l'RNA, legato alla membrana, sono stati aggiunti alla colonnina 30 μ l di H₂O priva di RNAsi ed è stata eseguita una centrifugazione a 8.000g per 1 minuto, raccogliendo l'eluato contenente l'RNA.

Per verificare la qualità dell'RNA ottenuto, sono stati seminati 2 μ l di campione in un gel di agarosio all'1% in tampone tris-acetato (TAE) 1X, con bromuro di etidio (10mg/ml) al 5% V/V; l'elettroforesi è stata eseguita a 60V per 20 minuti. L'RNA estratto è stato poi quantificato tramite lettura allo spettrofotometro. È stata preparata una diluizione 1:200 del campione di RNA e sono state determinate le assorbanze (A) alle lunghezze d'onda di 260nm (λ dei nucleotidi) e 280nm (λ delle proteine). È stato calcolato, dunque, il rapporto A_{260}/A_{280} : in caso di un valore inferiore a 2, il preparato di RNA è contaminato da proteine e non è utilizzabile. È stata, infine, calcolata la concentrazione di RNA del campione, applicando la seguente formula:

$$A_{260} \times \text{fattore di diluizione} \times 40 = \text{concentrazione dell'RNA in } \mu\text{g/ml.}$$

Il valore 40 corrisponde alla concentrazione di RNA espressa in $\mu\text{g/ml}$, alla quale si ottiene A_{260} pari a 1.

Analisi del genotipo KIR

Reazione a catena della polimerasi (PCR)

La sequenza da amplificare viene determinata in modo univoco da due oligonucleotidi sintetici di circa venti basi (denominati primer), ognuno complementare ad un tratto terminale della regione da amplificare e con l'estremità 3' rivolta verso l'interno della sequenza bersaglio.

La reazione di amplificazione permette di ottenere un elevato numero di copie del DNA stampo, mediante la ripetizione ciclica di tre fasi che avvengono a temperature diverse; dopo molti cicli si giunge ad un “plateau” nella sintesi a causa della rinaturazione dei frammenti a singolo filamento e dell'eccesso di substrato (determinato dal DNA neo-sintetizzato).

Le tre fasi che vengono ripetute ciclicamente sono:

- Denaturazione: posti ad elevata temperatura (94°C) i due filamenti che costituiscono il DNA stampo si separano e diventano quindi disponibili per l'appaiamento dei primer.
- Ibridazione o *annealing*: a temperatura inferiore e specifica per ogni coppia, i primer si appaiano alle loro sequenze complementari presenti sul DNA stampo. Poiché anche i filamenti di DNA stampo tendono a rinaturare, è necessario che i primer siano presenti in eccesso nella miscela di reazione.
- Estensione: utilizzando come copia il DNA bersaglio, la DNA polimerasi sintetizza un nuovo filamento di DNA. La durata dell'estensione dipende dalle dimensioni del frammento da amplificare.

La miscela di una reazione di amplificazione è così costituita:

- i quattro dNTP necessari per la sintesi dei nuovi filamenti;
- la Taq DNA polimerasi: si tratta di una DNA polimerasi termoresistente e pertanto stabile anche alla temperatura di 94°C e con un'attività 5'→3' polimerasica e 5'→3' esonucleasica. In genere la temperatura ottimale per la polimerizzazione è attorno ai 72°C. Per questa tesi è stata utilizzata l'AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA), una versione ricombinante della classica *Taq* che viene prodotta in *E. coli*, fornita in una forma inattiva; l'attivazione infatti richiede un passaggio iniziale ad una temperatura di 94-95°C per almeno 7 minuti. L'utilizzo di questo enzima ci ha permesso di allestire una PCR *Hot Start*, che prevede una fase iniziale ad alta temperatura per l'attivazione della Taq polimerasi. Questa procedura ha il vantaggio di ottimizzare il corretto appaiamento dei primer, evitando la formazione di prodotti aspecifici e di dimeri dei primer stessi.
- il tampone di reazione con la concentrazione ionica ottimale per l'attività della polimerasi utilizzata. La DNA polimerasi è sensibile alla concentrazione di ioni magnesio e presenta attività massima a concentrazioni di MgCl₂ pari a 1.5-2 mM mentre per concentrazioni di 10 mM si ha una inibizione dell'attività del 40-50%.

- DMSO (dimetil solfossido): soluzione utile a migliorare la resa e la specificità della PCR, soprattutto nei casi in cui l'amplificazione è ostacolata dalla presenza di strutture secondarie o da un alto contenuto di GC nella sequenza *target*.

Per evitare problemi di contaminazione, la miscela di reazione viene preparata con micropipette impiegate solo per PCR, utilizzando un'apposita cappa adibita unicamente a questo scopo.

Amplificazione dei geni *killer immunoglobulin-like receptor* tramite PCR-SSP

L'amplificazione tramite PCR è stata utilizzata per definire il genotipo KIR dei pazienti affetti da NK-LDGL e dei controlli normali. Quindici diversi geni KIR (riferiti a 12 *loci* differenti) sono stati amplificati impiegando un pannello di primer sequenza-specifici (SSP) (tabella 2). Le coppie di primer sono state disegnate per attaccarsi a posizioni polimorfiche uniche di ciascun gruppo di KIR e sono state scelte in modo tale da limitare la lunghezza dei prodotti di amplificazione a non più di 2 kb. Per individuare i geni di cui si conoscono due gruppi di varianti alleliche ad un dato *locus*, abbiamo utilizzato coppie di primer alternative. I geni con diversi alleli conosciuti sono KIR2DL1, 2DL5, 2DS1, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1 e 3DS1. Come si può notare dalla tabella 2 per alcuni di questi geni (KIR2DL1, 2DL5, 2DS1, 2DS3 e 3DL1) è stato utilizzato un uguale primer *forward* o *reverse* ed un secondo primer diverso discriminante le varianti alleliche.

Le condizioni di PCR utilizzate non sono identiche per tutte le reazioni di amplificazione e sono state preliminarmente standardizzate per ottenere quelle ottimali per ciascuna coppia di primer.

Per la maggior parte dei KIR la miscela di reazione (15 µl totali) è stata così preparata:

7,21	µl	H ₂ O sterile
1,5	µl	Buffer 10X (Applied Biosystems)
0,9	µl	MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)
0,3	µl	di ogni dNTP 10 mM (Applied Biosystems)
0,15	µl	DMSO (Sigma, Steinheim, Germany)
0,04	µl	DNA Polimerasi Taq Gold 5 U/µl (Applied Biosystems)
1,0	µl	DNA 30 ng/µl
1,5	µl	primer <i>forward</i> 4 pM/µl (Invitrogen, Paisley, UK)
1,5	µl	primer <i>reverse</i> 4 pM/µl (Invitrogen)

Tabella 2. Primer sequenza specifici (SSP) utilizzati per determinare il genotipo KIR di pazienti e controlli.

Gene KIR	Primer forward	Primer reverse	bp	Referenza
KIR2DL1	act cac tcc ccc tat cag g	agg gcc cag agg aaa gtc a	1750	30
KIR2DL1v	act cac tcc ccc tat cag g	agg gcc cag agg aaa gtt	1750	30
	act cac tcc ccc tat cag g	agg gcc cag agg aaa gtk	1750	30
KIR2DL2	cca tga tgg ggt ctc caa a	gcc ctg cag aga acc tac a	1800	32
KIR2DL3	cct tca tgc ctg gtg ctg	cag gag aca act ttg gat ca	798	32
KIR2DL4	gta tgc cca gac acc tgc atg ctg	gca ggc agt ggg gac ctt aga ca	1082	37
KIR2DL5.1	ctc ccg tga tgt ggt caa cat gta aa	ggg gtc aca ggg ccc atg agg at	1883	37
KIR2DL5.2	gta cgt cac cct ccc atg atg ta	ggg gtc aca ggg ccc atg agg at	1893	37
KIR2DS1	tct cca tca gtc gca tga r	agg gcc cag agg aaa gtt	1800	32
	tct cca tca gtc gca tga r	agg gcc cag agg aaa gtk	1800	37
KIR2DS2	tgc aca gag agg gga agt a	cac gct ctc tcc tgc caa	1750	32
KIR2DS3	tca ctc ccc cta tca gtt t	gca tct gta ggt tcc tcc t	1800	32
	gac atg tac cat cta tcc ac	gca tct gta ggt tcc tcc t	130	37
KIR2DS4	atc ctg caa tgt tgg tgc	ctg gat aga tgg tac atg tc	1902	37
KIR1D	atc ctg caa tgt tgg tgc	ctg gat aga tgg agc tgc ag	1885	37
KIR2DS5	aga gag ggg acg tt t aac c	tcc gtg ggt ggc agg gt	1950	30
	ctg cac aga gag ggg acg tt t aac c	tcc aga ggg tca ctg ggc	179	37
KIR3DL1	tac aaa gaa gac aga atc cac a	tag gtc cct gca agg gca a	1600	30
	tcc cat ctt cca tgg cag at	tag gtc cct gca agg gca a	1600	30
KIR3DL2	cgg tcc ctt gat gcc tgt	gac cac acg cag ggc ag	1900	32
KIR3DL3	gga cct aca gat gtt gc	tag ttg acc tgg gaa ccc g	1575	30
KIR3DS1	ggc aga ata ttc cag gag g	agg ggt cct tag aga tcc a	1750	32
	cag cgc tgt ggt gcc tgc c	ctg tga cca tga tca cca t	249	37

Per i geni KIR 2DL5.1, 2DL5.2 e le 2 varianti di 2DS1, tutti i reagenti sono in quantità doppia per un volume totale di reazione di 30 µl ed è stata raddoppiata anche la concentrazione di partenza dei primer. Inoltre il DMSO è sostituito con acqua sterile, infatti, l'utilizzo di questo reagente, seppur utile per mantenere lineari gli amplificati, non è risultato vantaggioso in tutti i casi e sperimentalmente si sono ottenuti migliori risultati non aggiungendolo alla miscela di reazione. Queste modificazioni sono state adottate per le difficoltà di amplificazione rilevate per questi geni KIR, rispetto agli altri.

La miscela di reazione (30 µl totali) che ne risulta è la seguente:

8,72 µl	H ₂ O sterile
3,0 µl	Buffer 10X
1,8 µl	MgCl ₂ 25 mM
0,6 µl	di ogni dNTP 10 mM
0,08 µl	DNA Polimerasi Taq Gold 5 U/µl
2,0 µl	DNA 30 ng/µl
6,0 µl	primer <i>forward</i> 4 pM/µl (Invitrogen)
6,0 µl	primer <i>reverse</i> 4 pM/µl (Invitrogen)

Il programma di amplificazione utilizzato per la maggior parte dei KIR è il seguente:

1 ciclo: 95°C 8 minuti attivazione dell'enzima
35 cicli: 95°C 30 secondi denaturazione del DNA stampo
55°C 45 secondi appaiamento dei primer
68°C 1.30 minuti estensione delle eliche di nuova sintesi
1 ciclo: 68°C 7 minuti estensione finale

Il programma di amplificazione utilizzato per KIR2DS1 (la prima variante), 2DS5 (la prima variante) e 3DL2 è il seguente:

1 ciclo: 95°C 10 minuti
35 cicli: 95°C 30 secondi
60°C 45 secondi
72°C 1.30 minuti
1 ciclo: 72°C 10 minuti

Il programma di amplificazione utilizzato per KIR2DL4, 2DL5.1, 2DL5.2 e 2DS1 (la seconda variante) è il seguente:

1 ciclo: 95°C 10 minuti
40 cicli: 95°C 30 secondi
65°C 45 secondi
68°C 1.30 minuti
1 ciclo: 68°C 10 minuti

25 µl degli amplificati 2DL5.1, 2DL5.2 e 2DS1 e 15 µl degli altri amplificati sono stati sottoposti ad elettroforesi in un gel di agarosio all'1% p/v in TAE 1X e bromuro di etidio al 5% v/v per 5 ore a 120 V. Il gel risultante è stato infine fotografato agli UV.

Amplificazione dei geni *killer immunoglobulin-like receptor* tramite PCR-SSP multiplex

Nel nostro laboratorio è stata in seguito sperimentata un'ulteriore metodica di amplificazione dei geni KIR, definita PCR-SSP multiplex⁸¹. I nuovi primer forniti da Sun J.Y.⁸¹ ci hanno permesso di avere una conferma dei nostri risultati e di verificare la validità della metodica di genotipizzazione precedentemente descritta.

Questa nuova metodica presenta, rispetto alla precedente PCR, diversi vantaggi: 1) permette di analizzare più campioni in minor tempo; 2) richiede una minor quantità di

reagenti; 3) consente di ottenere buoni risultati anche in presenza di DNA parzialmente degradato in quanto la lunghezza degli ampliconi è compresa tra 108 e 565 bp.

Tuttavia, questa metodica non ci ha consentito di abbandonare completamente la precedente PCR in uso, in quanto non permette la distinzione delle due varianti alleliche del KIR2DL5 (5.1 e 5.2). Per questa nuovo metodo di PCR sono state utilizzate 14 coppie di primer suddivise in 4 distinte reazioni di multiplex. I nuovi primer sono sequenza specifici e permettono di ottenere 15 ampliconi tra i quali è compresa una variante deleta del KIR2DS4, denominata KIR2DS4r. Le 4 diverse reazioni di multiplex permettono di amplificare i seguenti KIR:

MIX 1: KIR 2DL1 (437bp), KIR 2DS3 (279bp), KIR 2DL4 (232bp) e KIR 2DL2 (164bp).

MIX 2: KIR 3DL1 (565bp), KIR 2DL3 (334bp), KIR 2DS2 (204bp) e KIR 3DS1 (171bp).

MIX 3: KIR 2DS1 (231bp), KIR 3DL2 (142bp) e KIR 2DL5 (113bp).

MIX 4: KIR 2DS5 (194bp), KIR 3DL3 (155bp), KIR 2DS4 (130bp) e KIR 2DS4r (108bp).

La miscela di reazione per ciascun campione è di 10 µl totali ed è composta da:

1,98	µl	H ₂ O sterile
1	µl	Buffer 10X (Applied Biosystems Branchburg, New Jersey, USA)
0,9	µl	MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)
0,25	µl	di ogni dNTP 10 mM (Applied Biosystems)
0,12	µl	DNA Polimerasi Taq Gold 5 U/µl (Applied Biosystems)
1,0	µl	DNA 15 ng/µl
4	µl	primer MIX (1, 2, 3 o 4)

Il programma di amplificazione utilizzato è comune alle 4 reazioni ed è il seguente:

1 ciclo:	95°C	10 minuti
3 cicli:	95°C	20 secondi
	68°C	60 secondi
30 cicli:	95°C	20 secondi
	65°C	40 secondi
	72°C	20 secondi
1 ciclo:	72°C	5 minuti

10 µl degli amplificati sono stati sottoposti ad elettroforesi in un gel di agarosio al 3% p/v in TBE 0,5X (tampone tris-borato) e bromuro di etidio al 5% v/v (da una soluzione madre di 10 mg/ml) per 3 ore a 100 V. Il gel risultante è stato infine fotografato agli UV.

Analisi dell'espressione genica dei KIR 3DL1 e 3DS1 mediante reverse transcription-PCR (RT-PCR)

Per l'analisi dell'espressione genica è innanzitutto necessario convertire l'RNA messaggero (mRNA) estratto in *complementary* DNA (cDNA) utilizzando il processo di retrotrascrizione; dopo questo primo passaggio, si può allestire la reazione di amplificazione del cDNA mediante PCR.

Reazione di retrotrascrizione

La RT-PCR è basata sull'attività dell'enzima retrotrascrittasi, una DNA polimerasi RNA dipendente, che genera un filamento complementare di DNA utilizzando l'RNA come stampo. In questa tesi è stato utilizzato come stampo l'RNA totale e la reazione è stata eseguita con un primer oligo-dT, in grado di appaiarsi alla coda di poliA tipica dell'RNA messaggero eucariotico. Ciò consente alla retrotrascrittasi di sintetizzare cDNA dalle molecole di mRNA presenti nella reazione. La retrotrascrittasi utilizzata è l'AMV (*avian myeloblastosis virus*); questo enzima ha un'attività polimerasica 5'→3' (con RNA o DNA come stampo) ed un'attività 3'→5' di RNasi H, che degrada il filamento di RNA della doppia elica RNA-DNA, prodotta durante la reazione.

Per la sintesi del cDNA è stato impiegato il kit di retrotrascrizione “*Reverse Transcription System*” (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

La miscela di reazione utilizzata è composta da:

4,0	µl	MgCl ₂ 25 mM
2,0	µl	Buffer 10X
2,0	µl	miscela dei 4 dNTP (dNTP <i>mix</i>) 10 mM
0,5	µl	enzima inibitore delle RNasi 40 U/µl (RNAsin)
0,75	µl	AMV retrotrascrittasi 25 U/µl
1,0	µl	primer Oligo dT 0,5 µg/ml
1,0	µg	RNA

H₂O priva di RNasi fino ad un volume finale di 20 µl.

La miscela è stata incubata per 15 minuti a 42°C, poi posta a 95°C per 5 minuti per bloccare la reazione ed infine posta in ghiaccio per qualche minuto. Il cDNA così ottenuto è stato conservato a -80°C.

Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

Il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione è stato impiegato per studiare l'espressione dei geni KIR3DL1 e KIR3DS1 nei linfociti granulati di 14 pazienti con NK-LDGL e di 10 donatori sani. Per amplificare in modo univoco i due KIR sono state utilizzate delle coppie di primer ricavate dalla letteratura (tabella 3). Inoltre, è stata eseguita l'amplificazione della β -actina per verificare l'integrità dei campioni analizzati.

Tabella 3. Sequenze dei primer impiegati per lo studio di espressione genica.

Gene	Primer forward	Referenza	Primer reverse	Referenza	bp
KIR3DL1	acatcgtgggtcacaggtcc	32	acaacttggatctgggctt	93	663
KIR3DS1	ggcaccagcaaccca	32	aagggcacgcatcatgga	32	247
β-actina	cgcgagaagatgaccagat	93	ttgctgatccacatctgctgg	93	734

La miscela di reazione (25 μ l totali) è così composta:

11,48	μ l	H ₂ O sterile
2,5	μ l	Buffer 10X (Applied Biosystems)
2,0	μ l	MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)
2,0	μ l	miscela dei 4 dNTP 25 mM (Applied Biosystems)
2,5	μ l	primer F 5 pmol/ μ l
2,5	μ l	primer R 5 pmol/ μ l
2,0	μ l	cDNA
0,02	μ l	DNA Polimerasi Taq Gold 5 U/ μ l (Applied Biosystems)

Il programma utilizzato per l'amplificazione dei KIR è il seguente:

1 ciclo:	94°C	7 minuti
5 cicli:	94°C	60 secondi
	61°C	60 secondi
	72°C	45 secondi
29 cicli:	94°C	30 secondi
	60°C	45 secondi
	72°C	45 secondi
1 ciclo:	72°C	10 minuti

Il programma per l'amplificazione della β -actina è il seguente:

1 ciclo: 94°C 10 minuti

27 cicli: 94°C 30 secondi

60°C 30 secondi

72°C 40 secondi

1 ciclo: 72°C 7 minuti

Infine, 15 μ l degli amplificati ottenuti sono stati sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio all'1% p/v in TAE 1X e con bromuro di etidio al 5% v/v, per 1 ora a 100 V.

Analisi dell'espressione genica di DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, STAT3 e SOCS3 mediante *Real Time-PCR*

Real Time-PCR

La *Real Time-PCR* è una tecnica che permette di monitorare in tempo reale la reazione di amplificazione del cDNA ed è basata sulla diretta correlazione tra l'emissione di fluorescenza e la quantità di cDNA amplificato.

Per quantificare i livelli di mRNA di ogni campione è stato adottato un metodo di quantificazione relativa che si riferisce ad una retta standard, costruita tramite diluizioni seriali (1:5, 1:25, 1:125) di un cDNA di controllo; nel nostro caso sono state utilizzate cellule T purificate da buffy coat.

Per ogni campione è stata eseguita l'amplificazione in duplice copia dei geni d'interesse, DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, SOCS3 e STAT3 e di un gene espresso costitutivamente in tutte le cellule, avente la funzione di normalizzatore interno, il GAPDH (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi). I primer utilizzati per amplificare i geni in esame sono elencati nella tabella 4, sono stati tutti trovati in letteratura, tranne quelli per SOCS3 che sono stati disegnati nel nostro laboratorio.

Tabella 4. Primer utilizzati nella reazione di *Real Time-PCR*.

Gene	Primer forward	Primer reverse	Referenza
GAPDH	cga cca ctt ttc aag ctc a	agg ggt cta cat ggc aac tg	82
DNMT1	cca aag ccc gag aga gtg cct cag	cct tag cag ctt cct cct cct t	49
DNMT3a	tat tga tga gcg cac aag aga gc	ggg tgt tcc agg gta aca ttg ag	82
DNMT3b	ggc aag ttc tcc gag gtc tct g	tgg tac atg gct ttt cga tag ga	82
SOCS3	cag ctc caa gag cga gta cca	aga agc cgc tct cct gca g	-
STAT3	agg agg agg cat tcg gaa a	agc gcc tgg gtc agc tt	83

Per le reazioni di *Real Time*-PCR è stato impiegato lo strumento 7000 *Sequence Detection System* (SDS, Applied Biosystems).

Il protocollo utilizzato per l'amplificazione prevede che per ogni campione da analizzare si utilizzi una miscela di reazione (15 µl totali) composta da:

- 1,5 µl cDNA
- 4,2 µl H₂O priva di RNasi
- 0,9 µl primer F 5 µM (Sigma)
- 0,9 µl primer R 5 µM (Sigma)
- 7,5 µl SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems), contenente la Taq polimerasi, i nucleotidi A, C, G, U, il tampone di reazione, il cloruro di magnesio, l'uracil N-glicosilasi (UNG) ed il SYBR Green.

Il protocollo di reazione utilizzato per eseguire la *Real Time*-PCR prevede un primo passaggio ad una temperatura di 50°C per 2 minuti: in questo modo avviene l'attivazione dell'enzima UNG che permette di degradare eventuali contaminazioni costituite da amplificati precedenti che presentano l'uracile (U) al posto della timidina (T). Il secondo passaggio avviene a 95°C per 10 minuti e porta alla disattivazione dell'enzima e alla denaturazione del cDNA stampo. A questo punto inizia la reazione di polimerizzazione che consiste in 45 cicli in cui si ripetono, in sequenza, le fasi di denaturazione (a 95°C per 15 secondi), appaiamento dei primer al cDNA ed estensione (a 60°C per 1 minuto).

Per ogni campione, è stato eseguito il rapporto tra le quantità iniziali di cDNA relative ai geni d'interesse e quelle relative al GAPDH.

ANALISI DEL *PATTERN* DI METILAZIONE DEI GENI KIR3DL1 E KIR3DS1

Modificazione del DNA con sale di bisolfito

Il DNA estratto da cellule NK purificate è stato trattato con il kit "*Methylamp DNA Modification*" (Epigentek, NY, USA). Il protocollo prevede la modificazione chimica del DNA con il bisolfito di sodio che agisce in modo specifico sulle citosine non metilate, deaminandole. In questo modo le citosine non metilate sono convertite in uracile, mentre quelle metilate non vengono modificate. Affinché l'efficienza della modificazione sia ottimale, la quantità di DNA di partenza deve essere compreso tra 50 e 200 ng.

Il protocollo prevede i seguenti passaggi:

- Aggiungere al campione di DNA un volume di acqua distillata fino a raggiungere un volume di 24 μ l e miscelare. Aggiungere successivamente 1 μ l di R1 (soluzione di denaturazione del DNA), miscelare e incubare il campione a 37°C per 10 minuti.
- Durante l'incubazione preparare la soluzione R1/R2/R3: aggiungere 1,1 ml di R3 (soluzione di modificazione del DNA) ad una fiala di R2 in polvere e miscelare con il vortex fino ad ottenere una soluzione limpida, senza cristalli. Aggiungere 40 μ l di R1 alla soluzione R2/R3 e miscelare.
- Al termine dell'incubazione aggiungere 125 μ l della soluzione R1/R2/R3 al campione. Miscelare ed incubare a 65°C per 2 ore.
- Porre una colonnina di purificazione in una provetta di raccolta. Aggiungere 300 μ l di R4 (soluzione per il recupero del DNA modificato) al campione, miscelare e trasferire tutto il volume nella colonnina. Centrifugare a 13.400g per 15 secondi ed eliminare l'eluato.
- Porre 200 μ l di R5 (soluzione per la purificazione del DNA modificato addizionata con etanolo al 100%) nella colonnina e centrifugare a 13.400g per 15 secondi.
- Aggiungere 10 μ l di R1 ad 1,1 ml di etanolo al 90%, miscelare ed aggiungere 50 μ l della soluzione ottenuta nella colonnina. Porre la colonnina per 8 minuti a temperatura ambiente, poi centrifugare per 15 secondi a 13.400g.
- Aggiungere 200 μ l di etanolo al 90% nella colonnina e centrifugare a 13.400g per 15 secondi. Eliminare l'eluato e ripetere tale passaggio centrifugando per 35 secondi.
- Porre la colonnina in una provetta sterile da 1,5 ml. Aggiungere 14 μ l di R6 (tampone di eluizione) direttamente sul filtro della colonnina e centrifugare a 13.400g per 20 secondi per eluire il DNA modificato.
- Conservare il DNA modificato a -20°C fino ad un massimo di due mesi.

PCR sul DNA modificato

Al fine di studiare la metilazione del gene KIR3DL1/3DS1 è stata eseguita una PCR sul DNA modificato che ha permesso di amplificare una regione genomica lunga approssimativamente 400 bp, comprendente il promotore e l'inizio del primo esone del gene KIR in analisi. In questa regione, infatti, sono normalmente localizzate le principali isole CpG per il controllo epigenetico dell'espressione genica tramite metilazione.

I geni KIR3DL1 e KIR3DS1 in analisi sono forme alleliche dello stesso gene ed occupano lo stesso *locus*. Al momento attuale, non è stato ancora condotto uno studio

approfondito del promotore di questo gene, ma la regione da noi esaminata sembra essere identica per i due alleli. Per questo motivo, i primer disegnati per amplificare tale sequenza non riescono a discriminare tra i due KIR in esame. Le sequenze dei primer utilizzati sono: KIR3DL1-F (5'-gga att ccg ttt ttt atg tta gta tag att tta-3')⁴¹ e KIR3DL1-R (5'-cgg gat ccc gcc ata tct tta cct cca aat c-3')⁴¹.

La miscela di reazione (50 µl totali) è stata così preparata:

2,0 µl	DNA modificato
27,5 µl	H ₂ O sterile
5,0 µl	Buffer 10X (Applied Biosystems)
3,0 µl	MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)
1,0 µl	di ogni dNTP 10 mM (Applied Biosystems)
4,0 µl	primer F 20 pM (Sigma)
4,0 µl	primer R 20 pM (Sigma)
0,5 µl	DNA Polimerasi Taq Gold 5 U/µl (Applied Biosystems)

Il programma di amplificazione utilizzato è il seguente:

1 ciclo:	94°C	7	minuti
35 cicli:	94°C	30	secondi
	48°C	30	secondi
	72°C	1	minuto
1 ciclo:	72°C	10	minuti

Per controllare la corretta riuscita della PCR, sono stati seminati 5 µl dell'amplificato in un gel di agarosio all'1,5% p/v in TAE1X, con etidio bromuro al 5% v/v. Il prodotto di PCR è stato poi conservato a -20°C.

Per evitare che i componenti della miscela di reazione della PCR inibiscano i passaggi successivi, è stata eseguita la purificazione del prodotto di PCR mediante l'utilizzo del kit "QIAquick PCR Purification" (QIAGEN). Successivamente 4 µl degli amplificati sono stati sottoposti ad un'elettroforesi di controllo in un gel all'1% di agarosio in TAE1X, con etidio bromuro al 5% v/v.

Clonaggio del prodotto di PCR

Il prodotto di PCR purificato è stato inserito nel vettore di clonaggio “pCR 2.1-TOPO” seguendo il protocollo del kit “*TOPO TA cloning*” (Invitrogen). Questa metodica consente l’inserzione diretta di prodotti di PCR, amplificati dall’enzima Taq Polimerasi, in un vettore plasmidico tramite un singolo passaggio.

Il vettore di clonaggio “pCR 2.1-TOPO” è un vettore plasmidico di 3.931 bp, presente nel kit in forma linearizzata, provvisto di code di poliT 3’ terminali e legato covalentemente all’enzima Topoisomerasi I (virus *Vaccinia*). I residui terminali di deossitimidina permettono all’inserito di PCR di legarsi efficacemente al vettore. Infatti, la Taq Polimerasi utilizzata nelle reazioni di amplificazione aggiunge alle estremità 3’ di entrambe le eliche del DNA neosintetizzato dei nucleotidi non corrispondenti allo stampo, solitamente deossiadensine. L’enzima Topoisomerasi I fornisce l’energia necessaria per il legame tra l’inserito ed il vettore plasmidico.

L’inserito da clonare si inserisce nel sito di policlonaggio (MCS, *Multiple Cloning Site*) situato all’interno di un breve tratto di DNA plasmidico (*lacZ α*), contenente le regioni regolatrici ed il frammento codificante la porzione amino-terminale dell’enzima β -galattosidasi. Le cellule di *E. coli*, trasformate con questo tipo di vettori, codificano la porzione carbossi-terminale della β -galattosidasi.

I due frammenti proteici codificati dal DNA cromosomico e dal plasmide possono associarsi secondo il processo di α -complementazione, e formare una proteina enzimaticamente attiva. Quando i ceppi di *E. coli*, capaci di produrre la β -galattosidasi, vengono fatti crescere su piastre di agar contenenti un substrato incolore detto X-gal, la demolizione di questa sostanza da parte dell’enzima suddetto produce un composto blu insolubile. Pertanto, le colonie di *E. coli* contenenti plasmidi privi dell’inserito di DNA esogeno risulteranno blu; al contrario, le colonie che portano l’inserito e che quindi possiedono un enzima inattivo saranno incolore. La resistenza all’ampicillina, presente nel vettore, rappresenta un fattore selettivo perché permette la crescita su piastre di agar arricchite con l’antibiotico solo di colonie di *E. coli* che siano trasformate con il vettore di clonaggio (figura 12). La miscela di reazione per la reazione di ligazione contiene:

1-4 μ l	amplificato
1,0 μ l	<i>Salt Solution</i> (Invitrogen)
1,0 μ l	vettore “pCR 2.1-TOPO” 10 ng/ μ l (Invitrogen)
H ₂ O	sterile fino ad un volume finale di 6 μ l.

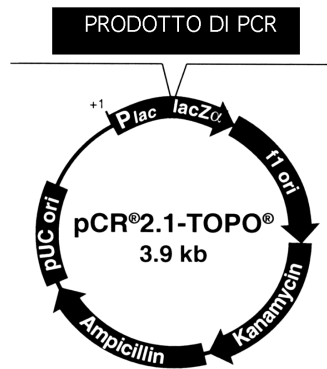


Figura 12. Vettore di clonaggio.

In ogni reazione di ligazione sono stati utilizzati 4 μ l del prodotto di PCR purificato. La reazione di ligazione è stata miscelata delicatamente, incubata a temperatura ambiente per 10-15 minuti e poi posta in ghiaccio. Nel frattempo le cellule di *E. coli* competenti (*TOP10*, Invitrogen), conservate a -80°C , sono state scongelate mantendole in ghiaccio.

Per trasformare un'aliquota di batteri *E. coli* pari a 50 μ l sono stati utilizzati i 6 μ l totali della miscela di ligazione. Dopo aver aggiunto, senza pipettare, il DNA plasmidico ricombinante, i batteri sono stati sottoposti a *shock* termico: la provetta con la reazione è stata posta in ghiaccio per 30 minuti, poi portata a 42°C per 30 secondi in un bagno termostato e quindi rimessa in ghiaccio per qualche minuto. Successivamente sono stati aggiunti 250 μ l di terreno SOC (fornito dal kit) a temperatura ambiente e la provetta è stata incubata a 37°C per 1 ora, in agitazione. Dopo l'incubazione, i batteri sono stati suddivisi in due aliquote, rispettivamente di 50 μ l e 250 μ l, piastrati in due capsule Petri con terreno di coltura Luria-Bertani (LB) addizionato con agar, ampicillina e X-gal e successivamente posti *O/N* a 37°C . Per la preparazione del terreno di coltura LB in 500 ml totali di H_2O sterile si sono sciolti 5,0 gr di triptone 1%, 2,5 gr di estratto di lievito 0,5%, 5,0 gr di NaCl 1%; il terreno viene poi portato a pH 7.00 con NaOH e autoclavato.

Per la preparazione del terreno solido si aggiungono 1,5 gr di agar in 100 ml di LB prima di autoclavare ed in seguito l'ampicillina ad una concentrazione finale di 50 $\mu\text{g/ml}$. Le piastre possono essere così conservate per alcuni mesi a $+4^{\circ}\text{C}$.

Miniprep

Le colonie bianche ottenute dalla trasformazione, sono state inoculate in 4 ml di terreno liquido di coltura LB, addizionato di 4 μ l di ampicillina (50 mg/ml) ed incubate in agitazione a 37°C *O/N*.

L'estrazione del DNA plasmidico dalle cellule batteriche cresciute in sospensione (*miniprep*) si basa su un protocollo di lisi alcalina sviluppato da Birnboim e Doly nel 1979. Tale protocollo sfrutta il fatto che i plasmidi sono molecole di DNA superavvolto, mentre il DNA cromosomico è molto più grande ed ha un livello di avvolgimento inferiore.

Queste differenze a livello topologico permettono la precipitazione selettiva del DNA cromosomico e delle proteine cellulari che, in questo modo, si separano dal DNA plasmidico e dall'RNA. La lisi cellulare avviene a pH alcalino (NaOH, pH 8.0) e induce la denaturazione degli acidi nucleici e delle proteine. Quando la soluzione viene neutralizzata mediante l'aggiunta del sale acetato di potassio (pH 5.5), il DNA cromosomico e le proteine precipitano sotto forma di aggregato macromolecolare perché incapaci di ritornare allo stato originale; al contrario, i plasmidi riescono a recuperare la conformazione nativa e rimangono in soluzione.

Il DNA plasmidico è stato estratto utilizzando il kit "QIAprep Spin Miniprep" (QIAGEN) ed il DNA ottenuto è stato conservato a +4°C.

Il protocollo prevede i seguenti passaggi:

- centrifugare gli inoculi batterici a 1.300g per 10 minuti con freno ed eliminare il sovrantante;
- risospendere il pellet in 250 µl del buffer di risospensione P1 (addizionato di RNase A solution), vorticare e poi trasferire il volume in una provetta da 2 ml;
- aggiungere 250 µl del buffer di lisi P2, mescolare gentilmente invertendo le provette 4-5 volte ed attendere non oltre i 5 minuti;
- aggiungere 350 µl del buffer di neutralizzazione N3 e mescolare immediatamente invertendo le provette 4-5 volte;
- centrifugare le provette a 17.900g per 10 minuti a 4°C;
- trasferire il sovrantante nelle colonnine QIAprep cercando di non toccare il pellet bianco;
- centrifugare le colonnine QIAprep a 17.900g per 30-60 secondi;
- aggiungere 750 µl del buffer di lavaggio PE e centrifugare a 17.900g per 30-60 secondi;
- eliminare il sovrantante e poi centrifugare una seconda volta le colonnine QIAprep a 17.900g per 60 secondi eliminando così il buffer PE residuo;
- inserire le colonnine in provette da 1,5 ml, successivamente aggiungere 30 µl di H₂O sterile sul filtro della colonnina ed infine centrifugare a 17.900g per 1 minuto eluendo in questo modo il DNA plasmidico. Conservare il DNA plasmidico a +4°C.

Controllo del clonaggio mediante restrizione

Per verificare che i plasmidi ottenuti dopo l'estrazione contengano effettivamente l'inserto, abbiamo eseguito una restrizione mediante l'enzima EcoRI; infatti, il vettore "pCR2.1-TOPO" (Invitrogen) possiede due siti di restrizione per l'endonucleasi EcoRI, fiancheggiati la regione in cui si inserisce l'inserto.

La miscela di reazione (50 µl totali) per ogni campione è composta da:

2,0	µl	DNA plasmidico
5,0	µl	<i>Buffer</i> N3
0,3	µl	EcoRI (NewEngland Biolabs, Beverly, MA)
42,7	µl	H ₂ O sterile

I campioni ottenuti sono stati poi sottoposti ad un'incubazione di 1 ora a 37°C. Successivamente, abbiamo seminato 25 µl della miscela di reazione in un gel di agarosio all'1% p/v in TAE1X con etidio bromuro al 5% v/v. I campioni di DNA plasmidico ricombinante sono stati identificati tramite la presenza nel gel di una banda lunga circa 400 bp, corrispondente al prodotto di PCR precedentemente clonato.

Sequenziamento

La reazione di sequenziamento è stata condotta utilizzando il metodo dei dideossinucleotidi, che consiste nella sintesi in vitro di un filamento di DNA ad opera di una polimerasi, utilizzando uno stampo di DNA a singolo filamento.

Per il sequenziamento è stato utilizzato il kit "*Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*" (Applied Biosystems), che contiene la "*Ready Reaction Mix*" composta da: 4 diversi deossinucleotidi marcati, DNA polimerasi *AmpliTaq*, MgCl₂ e tampone Tris-HCl (pH 9.0). L'enzima utilizzato è una variante della DNA polimerasi *Taq*: nel sito attivo contiene infatti una mutazione puntiforme che causa una minore discriminazione verso i dideossinucleotidi. Questo enzima ha inoltre una seconda mutazione nel dominio aminoterminale che elimina virtualmente l'attività 5'→3' esonucleasica della DNA polimerasi *AmpliTaq*.

Per un singolo inserto sono state allestite due reazioni di sequenziamento, ognuna condotta con un singolo primer: il primer KIR3DL1-F per la sintesi del filamento *forward* ed il primer KIR3DS1-R per il filamento *reverse*. Le reazioni di sequenziamento sono state

condotte con il metodo del “*cycle sequencing*” che sfrutta la ripetizione dei cicli di denaturazione termica, allineamento ed estensione per aumentare il livello del segnale e, contemporaneamente, diminuire la quantità di DNA stampo richiesta.

La miscela di reazione per ogni singolo campione contiene:

8,0 µl	Ready Reaction Mix (scongelata in ghiaccio)
1,0 µl	primer F o R 3,2 pM/µl
8,0 µl	H ₂ O sterile
3,0 µl	DNA (200 ng circa)

La reazione di “*cycle sequencing*” è stata programmata secondo le seguenti condizioni:

25 cicli:	96°C	10	secondi
	50°C	5	secondi
	60°C	4	minuti

I prodotti di PCR sono stati purificati tramite l’utilizzo delle colonnine CENTRI-SEP (Applied Biosystems). Questo procedimento permette di eliminare i BigDye Terminator ed altri reagenti in eccesso.

Dopo la purificazione i campioni da sequenziare sono stati sottoposti alla seguente procedura:

- aliquotare nelle provette utilizzate per sequenziare: 12 µl di *Template Suppression Reagent* (TSR, Applied Biosystems) e 10 µl di campione purificato;
- vorticare e centrifugare i campioni;
- porre i campioni a 95°C per 2 minuti per la denaturazione del DNA, riportarli a +4°C e conservarli in ghiaccio fino all’uso.

Il TSR è un tampone che serve per mantenere denaturati i filamenti da sequenziare. Il sequenziatore utilizzato, ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer*, è dotato di un sistema di elettroforesi capillare provvisto di un laser che induce fluorescenza.

I campioni sono stati introdotti nel capillare precedentemente riempito con un polimero (*POP6*, Applied Biosystems); i frammenti di DNA marcati sono stati quindi sottoposti ad una corsa elettroforetica attraverso il polimero nel quale si separano in base al loro peso molecolare. Durante l’elettroforesi i frammenti passano attraverso la finestra ottica del

capillare e qui vengono colpiti dal raggio laser: i fluorocromi coniugati ai 4 diversi dideossinucleotidi (*BigDye Terminator*) emettono luce ad una lunghezza d'onda specifica e tale caratteristica viene sfruttata per identificare le diverse basi che compongono la sequenza di DNA in analisi. La luce emessa viene raccolta e separata da uno spettrografo a seconda della lunghezza d'onda. I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il *software* “*Sequencing Analysis*”: tale programma elabora i segnali di fluorescenza raccolti dall'ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer* e li converte nei picchi dell'elettroferogramma, la rappresentazione grafica da cui l'operatore può determinare la sequenza nucleotidica.

Screening delle isole CpG metilate

Ogni sequenza ottenuta, che rappresenta per convenzione il filamento stampo, è stata confrontata con la sequenza *consensus* originale, ottenuta presso il sito <http://www.genecards.org> (GeneID 3811).

Dal confronto della stessa regione genomica prima e dopo il trattamento con il sale di bisolfito abbiamo distinto le sequenze dinucleotidiche CpG metilate da quelle non metilate. Infatti, poiché il trattamento modifica in uracile le citosine (C) non metilate, nella sequenza in analisi queste ultime vengono sostituite da timine (T); al contrario, le C metilate rimangono immutate e vengono ritrovate come C.

COLTURE CELLULARI

I PBMC sono stati coltivati in apposite piastre alla concentrazione di $1-2 \times 10^6$ di cellule/ml, con terreno RPMI1640, contenente L-glutamina (2 mM) e HEPES (25 mM) (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA), addizionato di FCS alla concentrazione del 10%. Al terreno sono stati aggiunti gli antibiotici penicillina (100 U/ml) e streptomina (100 µg/ml, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA). Le cellule sono state mantenute a 37°C in un incubatore a flusso di CO₂ al 5% ed in ambiente umido. Tutti i trattamenti delle cellule sono stati fatti sotto cappa sterile a flusso laminare (*Biohazard*).

Le colture cellulari sono state utilizzate per le seguenti analisi:

1) la valutazione della mortalità dei GL dopo 2 ore e dopo 1, 3, 5 e 7 giorni in seguito a somministrazione della chemochina CXCL16 (10 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) o dell'agente apoptotico desametasone (10 ng/ml) (Sigma Aldrich; Milano, Italia) o dei due fattori insieme;

2) per la valutazione dei livelli d'espressione di SOCS3 dopo somministrazione di IL-15, IL-2 e PHA (fitoematoagglutinina) (10 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) dopo 2, 12 e 24 ore e di SOCS3 e STAT3 dopo somministrazione di IL-6 (10 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) dopo un'ora.

TEST DI VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI MEDIANTE ANNESSINA V

Il test di valutazione dell'apoptosi mediante annessina V (Kit *Bender MedSystem*, Vienna, Austria) permette d'identificare le cellule apoptotiche con la citometria a flusso, analizzando il legame dell'annessina V (AnV), coniugata con il fluorocromo FITC, alla fosfatidilserina (PS). L'apoptosi è caratterizzata da una varietà di modificazioni morfologiche: la perdita dell'asimmetria e delle proprietà di legame della membrana, la condensazione del citoplasma e del nucleo ed il clivaggio internucleosomico del DNA. Una delle prime fasi di apoptosi è la traslocazione del fosfolipide di membrana PS dal foglietto interno a quello esterno della membrana plasmatica. In questo modo, i siti di legame sulla PS diventano accessibili all'annessina V, una proteina di 35-36 KDa Ca^{2+} -dipendente, con alta affinità per la PS. La traslocazione della PS precede altri eventi, come la perdita dell'integrità della membrana plasmatica, la frammentazione del DNA e la condensazione della cromatina. Perciò l'AnV-FITC può essere usata come indicatore delle cellule in apoptosi precoce.

Di conseguenza le cellule possono risultare o negative all'AnV, quindi considerate vitali, o positive all'AnV, considerate in apoptosi.

Il test è stato effettuato utilizzando il protocollo descritto nel kit della *Bender (Bender MedSystem)*. Un quantitativo di 5×10^5 PBMC sono stati lavati in PBS, risospesi in 195 μl di tampone di legame (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl_2) precedentemente diluito 1:4 in acqua bidistillata, ed incubati con 5 μl di AnV-FITC, 4 μl di anti-CD16-PE (Ficoeritrina), 4 μl di anti-CD8-TC (Tricolor) e 4 μl di anti-CD3-APC (Allofococianina), al buio per 10 minuti a temperatura ambiente. La marcatura permette di individuare nella popolazione di PBMC i GL e la loro controparte normale. Dopo un lavaggio in PBS, il pellet è stato risospeso in 200 μl di tampone di legame. Infine, è stata effettuata la lettura al citofluorimetro.

Tutti i campioni sono stati analizzati usando l'analizzatore FACSCalibur (*Becton Dickinson*).

ALLESTIMENTO PREPARATI PER MICROSCOPIO CONFOCALE

I GL (40×10^3 cellule) sono stati fatti aderire su vetrini precedentemente ricoperti con polilisina alla concentrazione di 50 $\mu\text{g/ml}$ e, di seguito, fissati con paraformaldeide (PFA 4%). Dopo lavaggio in PBS, è stata effettuata la permeabilizzazione con Triton X-100 0,1% e Sodio Citrato 0,1% prima di procedere alla saturazione con PBS-BSA 2%. Le cellule sono state poi incubate per un'ora a temperatura ambiente (oppure *overnight* a 4°C) con gli anticorpi primari anti-CXCL16 *goat anti-human* IgG (5 $\mu\text{g/ml}$) e anti-CXCR6 *mouse anti-human* IgG_{2B} (25 $\mu\text{g/ml}$) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) e, dopo tre lavaggi con PBS, sono state lasciate per 30 minuti al buio con l'anticorpo secondario *Alexa Fluor 488 donkey anti-goat* (1 $\mu\text{g/ml}$) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Quindi sono state lavate di nuovo per tre volte con PBS e poi lasciate per 30 minuti al buio con un altro anticorpo secondario, il *Texas Red goat anti-mouse* (1 $\mu\text{g/ml}$) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Infine, si effettuano tre lavaggi in PBS e il vetrino viene chiuso con un vetro coprioggetto.

I vetrini sono stati osservati al microscopio confocale Leica TCS SP5 (*Leica*, Milano, Italia). Le immagini acquisite sono state ulteriormente elaborate mediante i software *Image J 3.14* e *Adobe Photoshop*.

PATCHING

La tecnica del *patching* serve a rilevare se una molecola della membrana cellulare, opportunamente marcata, si localizzi nei *lipid rafts*, microdomini lipidici della membrana cellulare. Questa tecnica ci è servita per individuare se CXCR6 si localizza all'interno dei *lipid rafts* dei GL.

La quantità di cellule necessarie sono $2,5 \times 10^6$ alla concentrazione di 1×10^6 di cellule/ml. Per individuare i *lipid rafts* vengono eseguiti i seguenti passaggi: viene marcata la molecola specifica dei *lipid rafts* GM1, con il frammento *rabbit cholera toxin B* (CTB) non coniugato (1 $\mu\text{g/ml}$) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), lasciandole ad incubare per 10 minuti in ghiaccio; quindi si incubano le cellule con l'anti-CTB non coniugato (1 $\mu\text{g/ml}$) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) per 15 minuti a 37°C; infine, si marca con l'anticorpo secondario *Texas Red goat anti-rabbit* IgG (1 $\mu\text{g/ml}$) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) per 10 minuti in ghiaccio e al buio. Questa marcatura viene fatta sui GL in sospensione e i lavaggi vengono fatti con RPMI filtrato + Ab + FCS 2%. Una volta marcati i *lipid rafts*, le cellule vengono fatte aderire al vetrino. CXCR6 viene marcato

direttamente sui GL adesi al vetrino. La marcatura viene effettuata con l'anticorpo primario anti-CXCR6 *mouse anti-human* (25 µg/ml) un'ora a temperatura ambiente e con anticorpo secondario *Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG* (1 µg/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) mezzora a temperatura ambiente e al buio. Dopo ogni marcatura si fanno tre lavaggi con PBS. Una volta chiuso il vetrino con un vetro coprioggetto è pronto per essere osservato al microscopio.

I vetrini sono stati osservati al microscopio confocale Leica TCS SP5. Le immagini acquisite sono state ulteriormente elaborate mediante i software *Image J 3.14* e *Adobe Photoshop*.

ANALISI STATISTICA

Tutti i dati sono stati espressi come media \pm errore standard della media; l'analisi statistica si è basata su test *t* di Student e sono stati considerati valori statisticamente significativi solo quelli con $p < 0,05$.

RISULTATI

ANALISI FENOTIPICA

Attraverso l'analisi citofluorimetrica, abbiamo ottenuto dati rappresentativi dei profili fenotipici delle cellule NK proliferanti nei pazienti affetti da NK-LDGL. Complessivamente sono stati analizzati i linfociti di sangue periferico di 35 pazienti e di 6 individui sani, utilizzati come controlli normali.

Tabella 5. Risultati dell'analisi fenotipica dei linfociti di sangue periferico dei 35 pazienti studiati.

Pz n.	GL x10 ⁹ /l	Espressione immunofenotipica dei KIR				
		EB6 KIR2DL1/S1	GL183 KIR2DL2/S2/L3	Z27 KIR3DL1/S1	Q66 KIR3DL2	FEST172 KIR2DS4
1	5.1	+	+	-	-	-
2	8.6	-	-	-	-	-
3	3.6	+	-	-	-	-
4	2.4	-	+	-	-	-
5	3.1	-	+	+	-	-
6	4.1	+	-	-	-	+
7	3.0	+	+	-	-	-
8	5.9	+	+	-	-	-
9	4.8	-	-	-	-	+
10	3.5	-	-	-	-	+
11	2.9	-	-	-	-	-
12	4.1	-	-	-	-	+
13	3.5	-	-	-	+	-
14	3.3	+	-	-	-	-
15	2.8	-	+	+	-	-
16	5.0	-	-	-	-	-
17	2.5	-	+	-	-	-
18	8.8	+	+	-	-	+
19	2.9	-	-	-	-	-
20	5.6	-	-	-	-	-
21	6.3	-	-	-	-	-
22	2.6	-	-	-	-	-
23	3.4	-	+	-	-	-
24	5.9	-	-	+	-	+
25	5.1	+	+	-	-	-
26	4.1	-	-	-	-	-
27	2.1	-	+	-	-	-
28	3.4	-	+	-	-	-
29	5.2	-	-	-	-	-
30	2.5	+	+	-	-	-
31	3.1	-	+	-	-	+
32	4.8	-	-	+	-	+
33	3.0	-	-	-	-	-
34	2.2	+	+	-	-	-
35	4.0	+	-	-	-	-

La presenza di ciascun recettore KIR è stata valutata sull'intera popolazione linfocitaria e confermata con l'analisi a doppia marcatura sulle cellule CD3- CD16+. A questo scopo, è stato utilizzato un pannello di anticorpi monoclonali anti-KIR che distinguesse fenotipicamente 5 sottopopolazioni all'interno del compartimento espanso di cellule NK. I risultati, riportati nella tabella 5, dimostrano come i KIR siano espressi sulla superficie delle cellule NK nella maggior parte dei pazienti analizzati, 25 casi su 35, e che in diversi pazienti l'intera popolazione delle cellule NK sia omogeneamente marcata da un solo anticorpo anti-KIR, mentre la popolazione di cellule NK dei controlli normali manifesti l'atteso fenotipo KIR eterogeneo, in cui sono presenti tutte e 5 le sottopopolazioni riconosciute da ciascun anticorpo utilizzato.

Complessivamente, i nostri dati attestano che la popolazione di cellule NK dei pazienti affetti da NK-LDGL, rispetto a quella degli individui normali, è caratterizzata da una rappresentazione anormale dei sottogruppi di cellule NK, dove il *pattern* di reattività agli anticorpi anti-KIR è ristretto. Inoltre, sulla base della espressione KIR, in un terzo dei pazienti è ipotizzabile la monoclonalità della proliferazione cellulare.

ANALISI GENOTIPICA

I profili genotipici dei KIR di 50 individui normali e di 35 pazienti sono riportati rispettivamente nelle tabelle 6 e 7. Le analisi sono state condotte tramite la tecnica di PCR-SSP, descritta in precedenza, che ha permesso di osservare l'assenza o la presenza di ciascun gene KIR. I geni analizzati per ogni individuo sono 15, per un totale di 22 reazioni di amplificazione: infatti, per alcuni geni sono state utilizzate più coppie di primer al fine di individuare tutti gli alleli finora noti. I due pseudogeni KIR2DP1 e KIR3DP1 non sono stati presi in esame in questo studio. A conferma dei dati, quasi tutte le analisi sono state ripetute con una nuova tecnica di PCR multiplex, sperimentata recentemente nel nostro laboratorio. Questa ulteriore prova ha confermato tutti i nostri risultati ottenuti con la precedente metodica.

I genotipi dei pazienti e dei controlli analizzati presentavano tra i 7 e i 15 geni (KIR2DS4 e KIR1D sono stati considerati come un unico gene, in quanto alleli dello stesso *locus*). Il confronto del contenuto genico (per genotipo) di entrambi i gruppi esibiva una media di 10 geni per il gruppo dei controlli e di 11 geni per i pazienti, senza evidenziare alcuna differenza significativa. Il quadro cambiava se veniva considerato il valore della moda (funzione statistica che restituisce il valore più ricorrente in un intervallo di dati). Osservando la frequenza di ogni genotipo, distinto per la numerosità dei geni KIR, il contenuto genico più

Tabella 6. Profili genotipici dei controlli. Le caselle grigie indicano la presenza dei singoli geni, le caselle bianche ne indicano l'assenza.

Controlli	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5a	2DL5b	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	1D	2DS5	3DL1	3DL2	3DL3	3DS1	
1, 2																	n.2
3																	
4 - 7																	n.4
8, 9																	n.2
10																	
11, 12																	n.2
13																	
14																	
15																	
16																	
17, 18																	n.2
19																	
20																	
21																	
22, 23																	n.2
24 - 26																	n.3
27																	
28																	
29 - 31																	n.3
32 - 37																	n.6
38																	
39																	
40																	
41																	
42																	
43																	
44																	
45																	
46																	
47																	
48																	
49																	
50																	

Tabella 7. Profili genotipici dei pazienti. Le caselle grigie indicano la presenza dei singoli geni, le caselle bianche ne indicano l'assenza.

pazienti	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5a	2DL5b	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	1D	2DS5	3DL1	3DL2	3DL3	3DS1	
1,2																	n.2
3-5																	n.3
6																	
7,8																	n.2
9-11																	n.3
12																	
13																	
14																	
15																	
16																	
18																	n.2
19																	
20																	
21																	
22,23																	n.2
24																	
25																	
26																	
27																	
28																	
29																	
30																	
31																	
32																	
33																	
34,35																	n.2

frequente diveniva di 8 geni nel gruppo di individui sani e di 14 geni in quello dei pazienti (figura 13). In questi ultimi sono quindi significativamente più frequenti genotipi a più alto contenuto genico ($p < 0,05$).

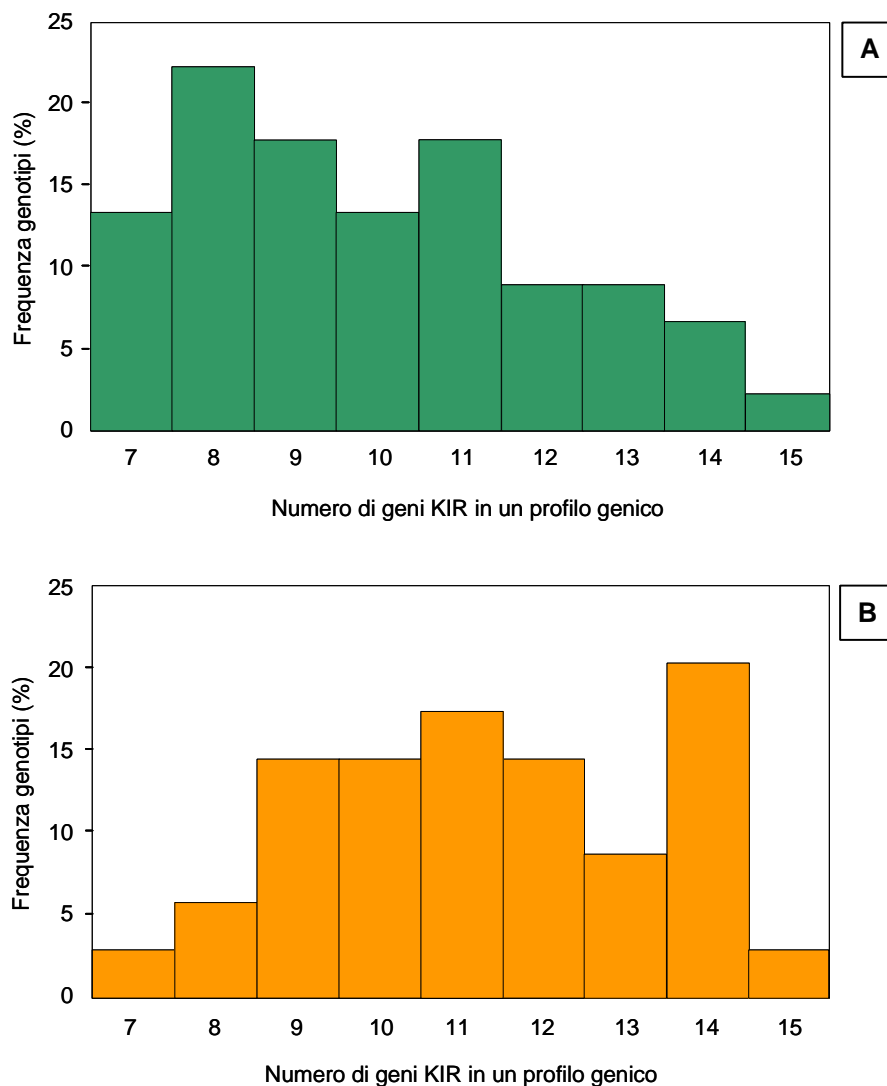


Figura 13. Istogrammi della frequenza di ogni genotipo distinto per il numero di geni che lo compongono nel gruppo di individui normali (pannello A) e in quello degli individui affetti da NK-LDGL (pannello B).

Questo dato non solo indica una differenza tra gli individui affetti ed i controlli sani, ma è anche discordante con quello riportato nella popolazione caucasica, in cui il numero più frequente di geni per genotipo è 7³³, risultato quasi interamente dovuto ad un'alta frequenza di genotipi omozigoti per l'aplotipo A (costituito da soli 7 geni). Infatti tutti gli altri genotipi, eterozigoti per la combinazione degli aplotipi A e B oppure omozigoti per l'aplotipo B, sono caratterizzati da un contenuto genico maggiore di 7. Le differenze fra genotipi date da un maggior numero di geni KIR, sono dovute ad una maggior presenza di geni KIR attivatori che, rispetto ai recettori inibitori, risultano numericamente più variabili.

Analisi delle frequenze dei profili genotipici

Gli studi condotti finora sulla popolazione caucasica indicano che per quanto vi sia vasta eterogeneità genotipica KIR all'interno di una popolazione, esistono profili genici più frequenti, in particolare quello costituito dall'aplotipo A in omozigosi. Carrington definisce che la sua frequenza nella popolazione caucasica sana sia del 27%⁸⁴ e Uhrberg sostiene che un individuo su tre ne sia in possesso³³. Questo dato è stato per noi di estremo interesse, perché sorprendentemente i dati da noi raccolti non hanno manifestato questa predominanza: l'omozigosi per l'aplotipo A è stata riscontrata in un solo individuo tra i pazienti (frequenza=0,03) e in 6 casi nel gruppo dei controlli (frequenza 0,12). Il risultato non è mutato neanche utilizzando una nuova metodica di amplificazione di recente sperimentazione, formulata e proposta da J.I. Sun *et al.*⁸¹. E' importante precisare che, nel nostro studio, tutti i genotipi KIR sono stati caratterizzati in accordo con il modello di Hsu *et al.*³⁰, che include la tipizzazione di 2 geni di recente scoperta: KIR1D e KIR2DL5. I profili da noi trovati appartengono prevalentemente al gruppo eterogeneo dei genotipi di tipo B caratterizzati dal possesso di più di un gene KIR attivatorio. L'analisi dei profili genotipici nel gruppo di controllo ha portato all'identificazione di 34 diversi genotipi KIR: 24 riscontrati una sola volta e 10 osservati da 2 a 4 volte ciascuno. Nel gruppo dei pazienti sono stati identificati 26 diversi genotipi KIR, 16 non ripetuti e 7 osservati da 2 a 3 volte. In ciascun gruppo sono stati identificati quindi alcuni genotipi condivisi da più di un individuo, tuttavia i profili ricorrenti osservati nel gruppo dei pazienti non sono stati rinvenuti nel gruppo di controllo e viceversa. Questi dati ci portano ad ipotizzare che determinati genotipi siano più facilmente ritrovabili nei pazienti affetti da NK-LDGL. Al contrario, tra i profili ritrovati una sola volta abbiamo identificato 2 profili genici condivisi dai due gruppi in esame (pz.19 con ctr.21 e pz.16 con ctr.28).

VALUTAZIONE DEI RECETTORI KIR3DL1 E KIR3DS1

Analisi del genotipo di KIR3DL1 e KIR3DS1

L'analisi immunofenotipica, condotta in precedenza nel nostro laboratorio su linee di cellule NK ottenute da pazienti con NK-LDGL⁸⁵, aveva evidenziato la tendenza delle cellule patologiche ad esprimere il recettore attivatorio KIR3DS1 rispetto al corrispondente

inibitorio. Abbiamo quindi voluto confermare tale osservazione conducendo analisi genotipiche e d'espressione dei due recettori in un gruppo di pazienti.

Innanzitutto, è stata valutata a livello genotipico la presenza o meno degli alleli KIR3DL1 e KIR3DS1 in 14 pazienti e 10 controlli normali tramite PCR-SSP su DNA e con i risultati ottenuti ne abbiamo calcolato le frequenze (tabella 8). L'allele KIR3DL1 è risultato presente, in entrambi i gruppi di studio, con una frequenza del 100%. Il KIR3DS1 è stato ritrovato nel gruppo di controllo con una frequenza dell'80% e nel gruppo dei pazienti con una frequenza leggermente inferiore (64%). Nel complesso, l'indagine non ha evidenziato differenze significative tra i controlli sani ed i pazienti analizzati, in particolare, l'allele inibitorio risulta presente con la stessa frequenza nei due gruppi.

Tabella 8. Risultati dell'analisi genotipica relativa ai KIR 3DL1 e 3DS1, condotta sui pazienti con NK-LDGL (pannello a sinistra) e sui controlli normali (pannello a destra). Le caselle colorate indicano la presenza dei rispettivi alleli.

pazienti	KIR3DL1 DNA	KIR3DS1 DNA	controlli	KIR3DL1 DNA	KIR3DS1 DNA
pz 1			ctr 1		
pz 2			ctr 2		
pz 3			ctr 3		
pz 4			ctr 4		
pz 5			ctr 5		
pz 6			ctr 6		
pz 7			ctr 7		
pz 8			ctr 8		
pz 9			ctr 9		
pz 10			ctr 10		
pz 11			frequenza	100%	80%
pz 12					
pz 13					
pz 14					
frequenza	100%	64%			

Espressione degli alleli KIR3DL1 e KIR3DS1

Una volta determinato il genotipo per il gene KIR3DL1/3DS1, ne abbiamo valutato l'espressione mediante RT-PCR nelle cellule NK isolate mediante *sorting* da pazienti affetti da NK-LDGL e da controlli normali (tabella 9). Per ogni paziente ed ogni controllo normale analizzato è stata amplificata anche la β -actina, in quanto gene costitutivamente espresso nelle

cellule, con lo scopo di controllare l'integrità del cDNA di partenza. I nostri risultati hanno evidenziato che la forma attivatoria KIR3DS1 è sempre espressa (100%) nei pazienti, confermando i dati immunofenotipici precedentemente ottenuti; inoltre, abbiamo potuto osservare che questo stesso gene, nei controlli sani, è espresso con una frequenza pari al 75%.

L'aspetto più interessante della nostra indagine è emerso, però, dai risultati di espressione dell'allele inibitorio: comparando tra loro i dati relativi ai due gruppi, analizzati mediante il test *t* di *Student*, è risultata significativa la ridotta espressione del recettore inibitorio KIR3DL1 nei pazienti (dimostrabile nel 21% dei casi) rispetto ai controlli sani, nei quali è espresso con una frequenza del 90% ($p < 0,05$) (tabella 9).

Tabella 9. Risultati dell'analisi dell'espressione dei KIR 3DL1 e 3DS1 nei pazienti con NK-LDGL (pannello a sinistra) e nei controlli normali (pannello a destra). Le caselle colorate indicano la presenza di geni e messengeri dei KIR analizzati.

Pazienti	KIR3DL1		KIR3DS1	
	DNA	mRNA	DNA	mRNA
pz 1	Orange	White	Orange	Orange
pz 2	Orange	Orange	Orange	White
pz 3	Orange	White	Orange	Orange
pz 4	Orange	White	White	White
pz 5	Orange	White	Orange	Orange
pz 6	Orange	White	White	White
pz 7	Orange	White	Orange	Orange
pz 8	Orange	White	White	White
pz 9	Orange	White	Orange	Orange
pz 10	Orange	White	White	White
pz 11	Orange	White	Orange	Orange
pz 12	Orange	White	White	White
pz 13	Orange	Orange	Orange	Orange
pz 14	Orange	Orange	Orange	Orange

controlli	KIR3DL1		KIR3DS1	
	DNA	mRNA	DNA	mRNA
ctr 1	Green	Green	Light Green	Light Green
ctr 2	Green	Green	White	White
ctr 3	Green	Green	Light Green	Light Green
ctr 4	Green	Green	Light Green	White
ctr 5	Green	Green	Light Green	White
ctr 6	Green	Green	Light Green	Light Green
ctr 7	Green	White	Light Green	Light Green
ctr 8	Green	Green	Light Green	Light Green
ctr 9	Green	Green	White	White
ctr 10	Green	Green	Light Green	Light Green

Analisi della metilazione a livello del promotore degli alleli KIR3DL1 e KIR3DS1

La mancanza d'espressione del recettore inibitorio KIR3DL1 nei pazienti affetti da NK-LDGL, ci ha indotto a focalizzare la nostra attenzione sulla metilazione del corrispondente promotore genico, per indagare se tale meccanismo epigenetico potesse essere responsabile della sua *down*-regolazione. Nel promotore sono normalmente localizzate le principali isole CpG, che permettono il controllo a livello genetico dell'espressione genica. La loro metilazione, infatti, come è confermato da diversi studi, rappresenta il principale

meccanismo responsabile della regolazione dell'espressione dei recettori KIR, sia nelle cellule NK di linea, che nelle cellule NK ottenute da donatori sani^{27,86}.

In generale, i promotori dei geni KIR presentano un elevato grado di similarità²⁷, che è tuttora oggetto di studio. Il KIR3DL1 ed il KIR3DS1, in quanto alleli dello stesso locus genico, ma codificanti due recettori con attività opposta, rappresentano un caso unico ed al momento attuale non è stata ancora compiuta un'analisi approfondita dei polimorfismi che caratterizzano il loro promotore. Tuttavia, la regione da noi esaminata, subito a monte del codone d'inizio, sembra essere identica per i due alleli. Per questo motivo, i primer utilizzati nella nostra indagine non permettono di discriminare tra le forme alleliche del KIR3DL1 e del KIR3DS1.

La valutazione dello stato di metilazione è stata condotta sulle cellule NK di 3 dei pazienti analizzati in questo studio (pz.1, pz.3 e pz.4). A livello genico, i pazienti n.1 e n.3 possiedono entrambi gli alleli ma esprimono solo il KIR3DS1, mentre il paziente n.4 presenta esclusivamente l'allele inibitorio e non lo esprime (tabella 9).

Come controlli sono stati analizzati 3 soggetti della popolazione sana, che hanno presentato risultati pressoché sovrapponibili. I controlli normali (ctr.1, ctr.3, ctr.6) presentano ed esprimono sia la forma inibitoria che attivatoria del recettore; le cellule studiate costituiscono la frazione della popolazione NK caratterizzata dalla mancata espressione di entrambi gli alleli; tali cellule, infatti, non vengono marcate, in presenza dell'anticorpo monoclonale Z27 (specifico per il KIR3DL1 ed il KIR3DS1), risultando quindi CD16+ CD3-ZIN-.

Come ci aspettavamo, tutte le sequenze dei controlli, ottenute dopo il trattamento, sono state ritrovate metilate (figura 14, pannello A). Diversamente, la maggior parte delle sequenze relative ai pazienti n.1 e n.3 sono risultate metilate e solo alcune, invece, completamente non metilate (3 su 10) (figura 14, pannello B). Poiché i due pazienti possiedono entrambi gli alleli a livello genico ma esprimono solo l'attivatorio, abbiamo ipotizzato che le sequenze metilate corrispondessero all'allele inibitorio non espresso; viceversa, quelle non metilate corrisponderebbero all'allele attivatorio, che viene invece trascritto. A conferma di questa ipotesi, le sequenze del paziente n.4, che presenta solo l'allele KIR3DL1 e non lo esprime, risultano tutte metilate (figura 14, pannelli B e C).

Affinché i risultati dell'indagine sulla metilazione fossero comparabili tra loro, abbiamo considerato solo le sequenze metilate, ovvero quelle che ipotizziamo corrispondano al promotore dell'allele KIR3DL1 silenziato; in seguito, per i pazienti e i controlli, sono state calcolate le frequenze di metilazione relative ad ogni isola CpG presente nel promotore (dati

non rappresentati). Infine, è stata eseguita la media delle frequenze dei pazienti e questa messa a confronto con quella dei controlli, mediante il test *t* di *Student* (figura 14, pannello D).

I dati ottenuti hanno evidenziato che nel promotore del KIR3DL1 dei pazienti vi è una maggiore frequenza di metilazione rispetto a quella del controllo ($p < 0,05$).

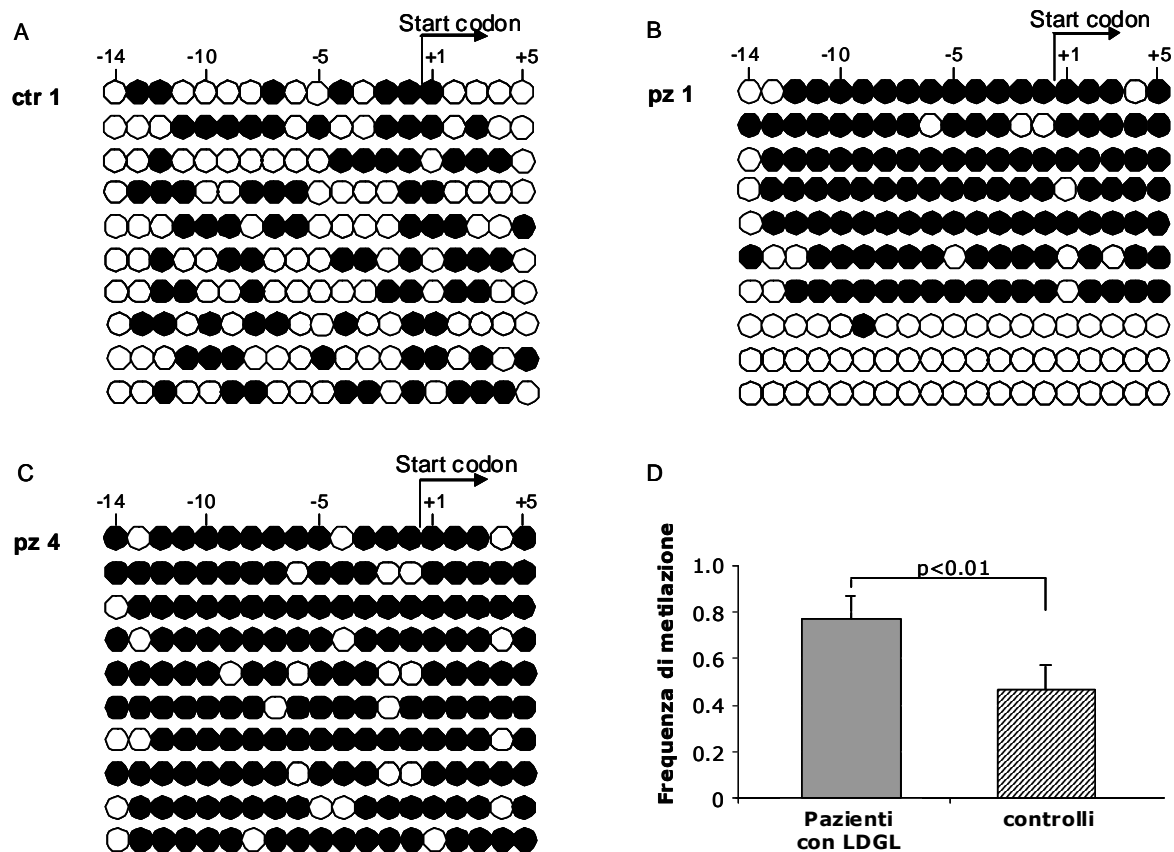


Figura 14. I pannelli A, B e C riportano il *pattern* di metilazione del gene KIR3DL1, quello A raffigura le sequenze di un controllo rappresentativo, quello B e C quelle di due pazienti rappresentativi. I cerchi pieni indicano le isole CpG metilate, quelli vuoti quelle non metilate. Nelle figure è indicata la posizione del sito d'inizio, indicato dalla freccia nera, e le isole CpG sono numerate prima e dopo il sito d'inizio in ordine progressivo. Per i controlli, l'analisi è stata ottenuta su cellule NK purificate CD3⁺CD16⁺KIR3DL1/KIR3DS1⁺, invece, per i pazienti l'analisi è stata ottenuta su cellule NK purificate CD3⁺CD16⁺. Come si può osservare dal numero di cerchi pieni nei pannelli A, B e C, la frequenza di metilazione risulta aumentata nei pazienti a confronto con i controlli, rispettivamente 0.76 ± 0.12 vs 0.49 ± 0.10 , $p < 0.05$, quindi la metilazione delle isole CpG correla con l'attività trascrizionale del gene KIR3DL1. Nel pannello D è riportato l'istogramma del valore medio della frequenza di metilazione riscontrato nei due gruppi di studio.

Espressione delle DNA metiltransferasi (DNMT)

Il meccanismo epigenetico della metilazione individua nelle DNMT i suoi principali effettori. Le differenze riscontrate tra pazienti e controlli, a livello di frequenza di metilazione, ci hanno indotto a valutare l'espressione delle 3 DNMT (DNMT1, DNMT3a e DNMT3b),

responsabili della metilazione del DNA. L'indagine è stata condotta, tramite l'impiego della metodica *Real Time-PCR*, sulle cellule NK isolate mediante *sorting* dai 14 pazienti e dai 10 controlli normali, affinché i valori di espressione ottenuti rispecchiassero realmente l'attività delle DNMT in queste cellule.

Per quanto riguarda le isoforme DNMT3a e DNMT3b, l'espressione del messaggero è risultata esigua e non quantificabile, in quanto inferiore al livello minimo di sensibilità dello strumento. Questo risultato è in linea con diversi studi, nei quali è stato dimostrato che queste due DNMT sono normalmente poco espresse⁸⁷.

Al contrario, i livelli d'espressione della DNMT1 sono stati rilevati sia per i pazienti che per i controlli normali e la successiva normalizzazione è stata eseguita sul gene GAPDH. La media dei valori dei pazienti è risultata pari a 5,07 (DS= 2,78) mentre quella dei controlli è di 4,98 (DS= 3,23). I dati sono stati analizzati mediante il test *t* di *Student* dal quale è emerso che le differenze fra le medie osservate non sono statisticamente significative (dati non rappresentati). Nel complesso, questi risultati ci hanno portato ad escludere le DNMT dai possibili fattori coinvolti nella deregolazione del *pattern* di metilazione e quindi nella patogenesi della LDGL di tipo NK.

VALUTAZIONE DI SOCS3 NELLA T-LDGL

Analisi d'espressione di SOCS3

Basandoci sul dato di letteratura che STAT3 sia costitutivamente attivato e *over*-espresso nella T-LDGL^{20,51}, abbiamo analizzato nei pazienti affetti i livelli di mRNA di SOCS3, la cui trascrizione viene attivata da STAT3 e che di STAT3 stesso è inibitore in un circuito a feedback negativo. Prima di studiare SOCS3, però, abbiamo voluto esaminare qual'era l'espressione effettiva di STAT3 nei pazienti e nei controlli del nostro studio, per verificarne la confrontabilità con i dati di letteratura. I dati sono stati ottenuti tramite *Real Time-PCR* sui GL isolati da PBMC di SP tramite la tecnica del *sorting*. Nei controlli normali sono state purificate e prese in esame le cellule CD8 *bright*, considerate gli equivalenti dei GL patologici nei normali. I risultati conseguiti su 19 pazienti e 11 controlli hanno confermato che l'espressione di STAT3 è più alta, in modo statisticamente significativo, nel gruppo dei pazienti ($1,29 \pm 0,68$) rispetto a quello dei controlli ($0,41 \pm 0,09$) (figura 15; $p < 0,05$) ed è emerso che l'espressione media di SOCS3 nei pazienti ($0,20 \pm 0,18$) non è diversa in modo statisticamente significativo da quella osservata nei controlli ($0,32 \pm 0,17$) (figura 16).

espressione di STAT3

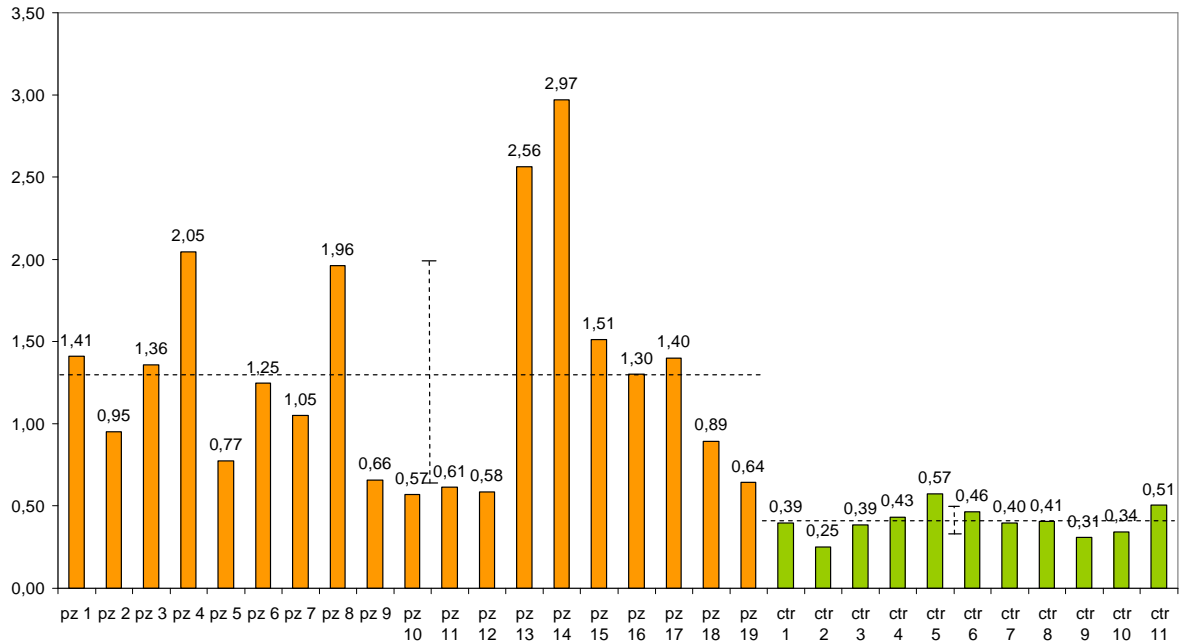


Figura 15. Istogramma dei livelli d’espressione di STAT3 nei GL dei pazienti, in arancione, e nelle cellule CD8 *bright* dei controlli, in verde. I valori sono stati ottenuti tramite *Real Time-PCR* e normalizzati su GAPDH. Nel grafico è riportata in linea tratteggiata la media di ciascun gruppo di studio con la relativa deviazione standard ($1,29 \pm 0,68$ nei pazienti e $0,41 \pm 0,09$ nei controlli), la differenza tra le medie è statisticamente significativa ($p < 0,05$).

espressione di SOCS3

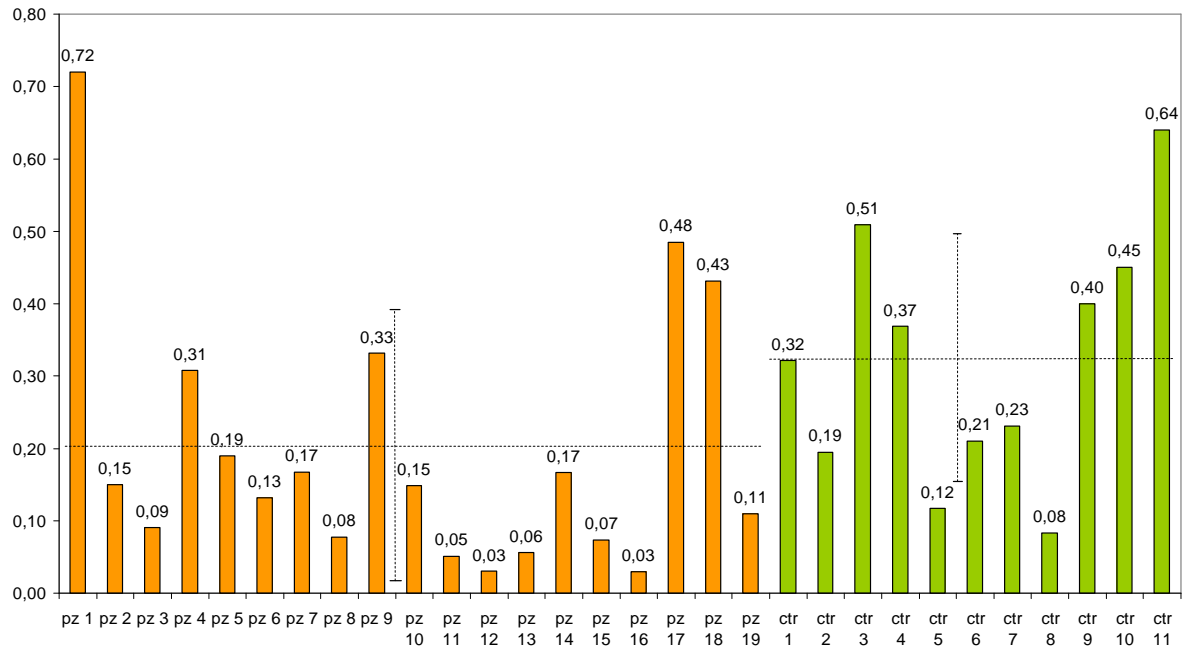


Figura 16. Istogramma dei livelli d’espressione di SOCS3 nei GL dei pazienti, rappresentati in arancione, e nelle cellule CD8 *bright* dei controlli, rappresentati in verde. I valori sono stati ottenuti tramite *Real Time-PCR* e normalizzati su GAPDH. Nel grafico è riportata in linea tratteggiata la media di ciascun gruppo di studio con la relativa deviazione standard ($0,20 \pm 0,18$ nei pazienti e $0,32 \pm 0,17$ nei controlli).

Quindi, abbiamo analizzato le variazioni dei livelli d'espressione di SOCS3 in risposta a citochine considerate importanti nello sviluppo della LDGL, quali l'IL-2 e l'IL-15^{22,68}, al fine di valutare se SOCS3 reagiva in modo adeguato o alterato a questi stimoli. Per ottenere questo dato, abbiamo messo in coltura i GL dei pazienti e le cellule CD8 *bright* dei controlli e abbiamo confrontato, a diversi tempi, la condizione *alone* con quella successiva alla somministrazione di IL-2 e/o IL-15, utilizzando il PHA come controllo positivo di stimolazione. I risultati emersi hanno indicato che le variazioni dei livelli di mRNA di SOCS3 in pazienti e controlli sono paragonabili. Più precisamente, rispetto alla condizione *alone*, abbiamo osservato un aumento dell'espressione del nostro gene d'interesse sotto entrambi gli stimoli, nei controlli come nei pazienti, e questo effetto era riscontrabile nelle prime ore di coltura, mentre, oltre le 24 ore, i livelli di mRNA si stabilizzavano a valori ridotti.

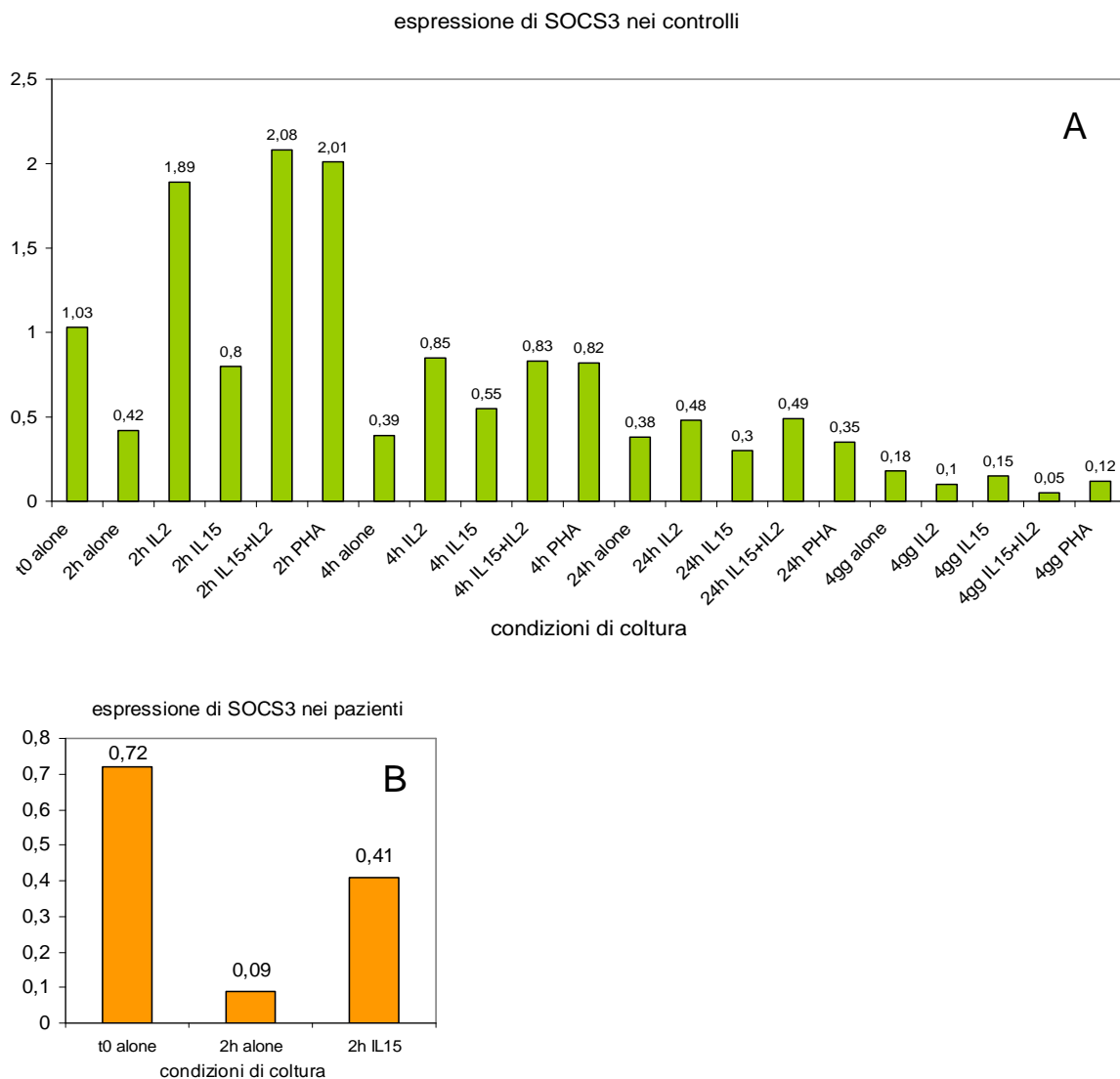


Figura 17. Il pannello A indica i risultati ottenuti da un campione rappresentativo dei controlli, quello B dei pazienti. L'ascissa indica i livelli d'espressione di SOCS3, ciascuna colonna rappresenta una condizione di coltura diversa per tempo e stimolo. I valori sono stati ottenuti tramite *Real Time-PCR* e normalizzati su GAPDH.

Da precisare, che con i CD8 *bright* da *Buffy Coat* è stato possibile costruire tutto il *pattern* d'espressione nelle diverse condizioni, mentre nei pazienti, per il limitato numero di cellule ricavabili, siamo riusciti a valutare solo un tempo, oltre a quello di partenza, e uno stimolo per campione (nella figura 17 il pannello A è rappresentativo dei controlli, il pannello B dei pazienti).

Da questi primi dati abbiamo potuto affermare che SOCS3 nei GL dei pazienti appare a livelli normali d'espressione e reagisce fisiologicamente all'IL-2 e all'IL-15.

Analisi del delta d'espressione tra SOCS3 e STAT3

I risultati ottenuti da questi primi esperimenti non sembravano indicare nessuna alterazione di SOCS3, ma considerando che i GL dei pazienti accumulano elevate quantità di STAT3 in forma attivata, ci aspettavamo di trovare una *over*-espressione anche a carico di SOCS3. Il nostro obiettivo successivo è stato quindi quello di affiancare i valori di STAT3 a quelli ottenuti di SOCS3 e per ciascun individuo abbiamo calcolato la differenza tra i livelli di mRNA di queste due proteine (figura 18). Dai dati conseguiti, è emerso che nei pazienti vi è un grande scarto d'espressione tra STAT3 e SOCS3, il cui valore medio è pari a $1,09 \pm 0,71$, mentre nei controlli l'espressione delle due proteine è quantitativamente simile, rendendo il delta d'espressione molto basso, la media risulta infatti pari a $0,09 \pm 0,20$. La differenza tra le due medie risulta statisticamente significativa (figura 18, pannello B; $p < 0,05$).

Questi risultati suggeriscono che, nella T-LDGL, SOCS3, invece di variare insieme a STAT3, suo attivatore di trascrizione, rimane inalterato come se ci fosse un blocco di comunicazione tra le due proteine o come se SOCS3 fosse incapace di controbilanciare STAT3.

A conferma di questa ipotesi, abbiamo cercato di ricreare nelle cellule CD8 *bright* dei controlli normali il quadro presente nei GL patologici, abbiamo quindi cercato di indurre l'aumento d'espressione di STAT3 per osservare la successiva reazione di SOCS3. Abbiamo messo le cellule CD8 *bright* in coltura *alone* o con aggiunta di IL-6, citochina che stimola la trascrizione prima di STAT3 e poi di SOCS3, e abbiamo osservato, tramite *Real Time*-PCR, i livelli d'espressione dei due geni d'interesse dopo un'ora. Queste analisi sono state condotte su 5 campioni. Dai dati ottenuti è apparso che, nelle cellule degli individui normali, SOCS3 aumenta la sua espressione in risposta all'IL-6 riducendo quasi a zero il delta con STAT3 o addirittura superandone i livelli d'espressione, difatti, contemporaneamente all'aumento di SOCS3, STAT3 perlopiù rimane invariato o aumenta leggermente (figura 19, pannello A).

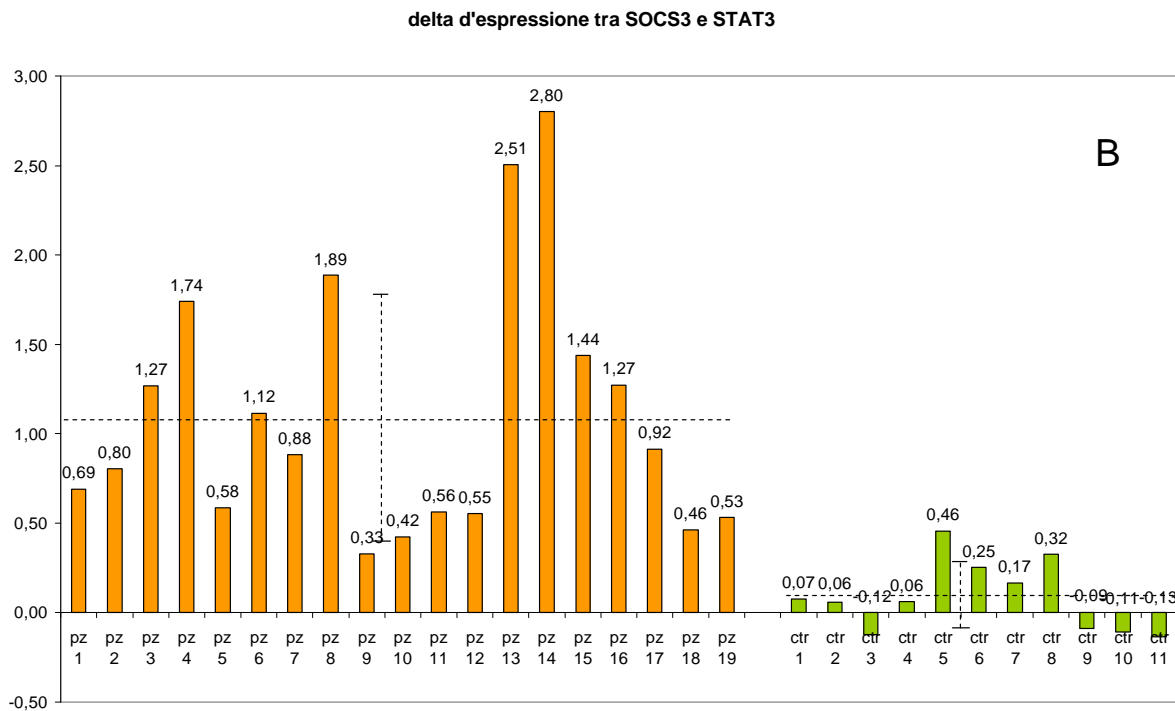
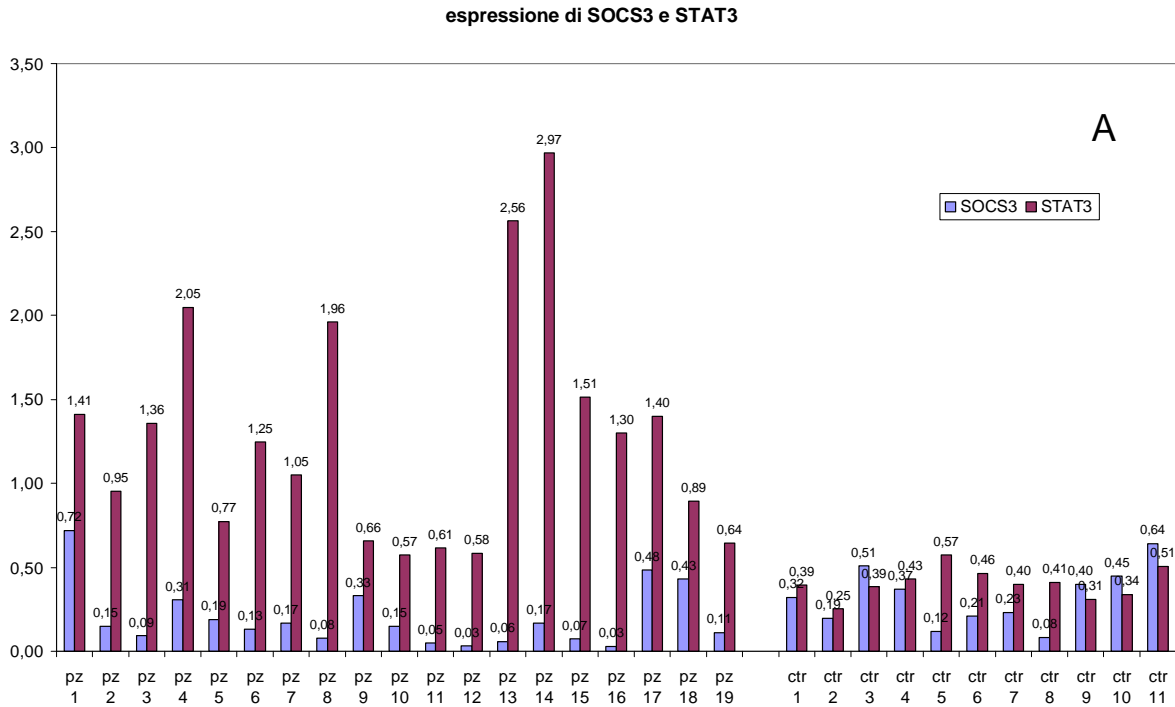


Figura 18. Pannello A) Istogramma dei livelli d'espressione di SOCS3 (colonne azzurre) e STAT3 (colonne viola). La parte sinistra del grafico riporta i dati ottenuti dai GL dei pazienti, la parte destra quelli ottenuti dalle cellule CD8 *bright* dei controlli. Pannello B) Rappresentazione grafica del delta d'espressione tra SOCS3 e STAT3, ogni colonna rappresenta la differenza tra il livello di mRNA delle due proteine in un individuo, in arancione sono indicati i pazienti e in verde i controlli. Nel grafico sono riportate in linea tratteggiata le medie di ciascun gruppo di studio con la relativa deviazione standard ($1,09 \pm 0,71$ nei pazienti e $0,09 \pm 0,20$ nei controlli). La differenza tra le medie è statisticamente significativa ($p < 0,05$). Tutti i valori sono stati acquisiti tramite *Real Time-PCR* e normalizzati su GAPDH.

Quest'ultimo risultato suggerisce che, a un'ora di coltura, STAT3 ha già svolto la sua funzione di trascrittasi, che ha come effetto l'innalzamento dei livelli di mRNA di SOCS3. SOCS3, in compenso, sembra mantenere stabili i livelli di STAT3. Al fine di supportare tale ipotesi, sarà necessario ripetere gli stessi esperimenti a tempi più brevi e ravvicinati, per seguire con precisione le variazioni d'espressione delle due proteine prima e dopo un'ora.

Gli stessi esperimenti li abbiamo condotti anche con le cellule dei pazienti per osservarne le risposte lì dove STAT3 è già ad alti livelli d'espressione. Abbiamo rilevato che le due proteine, dopo un'ora di coltura con IL-6, in 3 pazienti su 5 rimangono quantitativamente quasi invariate, lasciando il delta d'espressione molto alto, negli altri 2 pazienti, SOCS3 rimane basso e vi è un aumento di STAT3, quindi il delta d'espressione aumenta (figura 19, pannello B). Questi risultati indicano che SOCS3 rimane inalterata anche dopo stimolazione e che STAT3 continua ad essere presente in uno stato di *over*-espressione in grado di aumentare ulteriormente sotto stimolo.

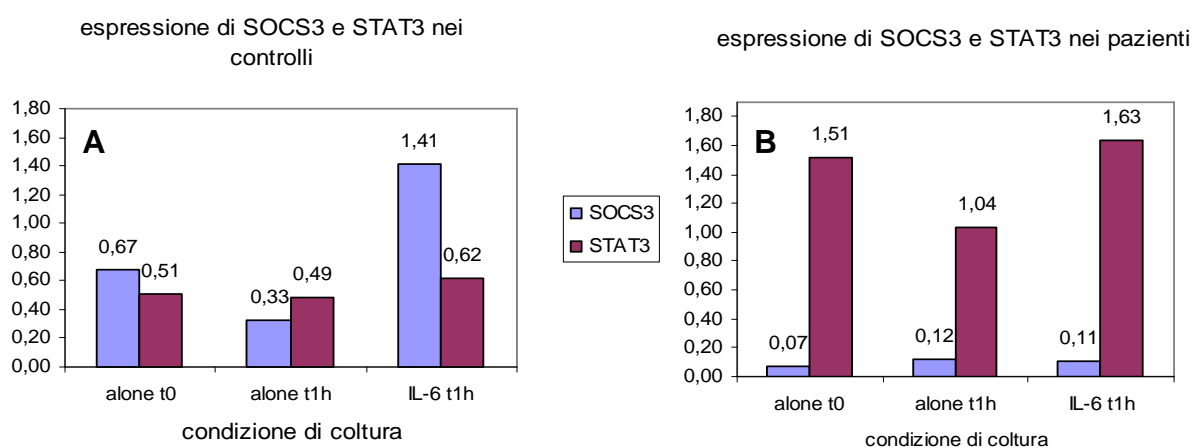


Figura 19. Il pannello A indica i risultati ottenuti da un campione rappresentativo dei 5 controlli (ctr.11), quello B dei 5 pazienti (pz.15). L'ascissa indica i livelli d'espressione di SOCS3 (colonne azzurre) e STAT3 (colonne viola). Ciascuna colonna rappresenta una condizione di coltura diversa per tempo e stimolo. I valori sono stati ottenuti tramite *Real Time*-PCR e normalizzati su GAPDH.

Complessivamente, i risultati raccolti sembrano dimostrare che nella T-LDGL l'attivazione patologica della via di segnale JAK/STAT non è solamente dovuta ad una *over*-espressione dei componenti della cascata, ma probabilmente anche alla perdita di fattori inibitori richiesti per l'equilibrio omeostatico dinamico.

Questi dati, seppur suggestivi, sono preliminari e devono essere confermati su un numero più alto di pazienti.

VALUTAZIONE DI CXCL16 NEI PAZIENTI CON LDGL DI TIPO CD3+ E CD3-

Analisi citofluorimetrica di CXCL16 e del suo recettore CXCR6

L'ultimo argomento di studio coinvolge entrambe le forme di LDGL. Grazie a precedenti analisi citofluorimetriche avevamo dimostrato che le cellule dendritiche plasmocitoidi rappresentano il *subset* prevalentemente presente a livello midollare nei pazienti con LDGL²¹. L'analisi di espressione della chemochina CXCL16 in queste cellule ha dimostrato una elevata espressione di questo antigene nelle DC dei pazienti affetti da LDGL. Sulla scorta di questo dato siamo andati a valutare la presenza di CXCR6, recettore specifico di CXCL16, sulla superficie cellulare dei GL. I valori sono stati ottenuti tramite analisi citofluorimetriche su SP di 14 pazienti con LDGL-CD3+, 12 pazienti con LDGL-CD3- e 5 controlli e su SM di 9 pazienti con LDGL-CD3+, 5 pazienti con LDGL-CD3- e 6 controlli. Nei grafici A e B, figura 20, sono illustrati i risultati riguardanti CXCR6 sui GL rispettivamente da SP e da SM. I grafici C e D illustrano i valori di CXCL16 sulle DC rispettivamente da SP e da SM. I risultati indicano la percentuale di cellule che presentano la proteina d'interesse (%) e l'intensità di fluorescenza media (MFI), valore quantitativo dei livelli d'espressione della proteina d'interesse. I dati dimostrano che CXCR6 non manifesta differenze significative tra il gruppo dei pazienti e quello dei controlli se non, a livello midollare, tra MFI di pazienti con LDGL-CD3- e controlli (6,20 vs 2,67) ($p < 0,05$). Il dato interessante riguarda piuttosto CXCL16, che risulta particolarmente espresso nei pazienti rispetto ai controlli, nello specifico, l'MFI è più alto nei pazienti con LDGL-CD3- che nei controlli nel SP (20,70 vs 7,60) ($p < 0,05$), e a livello di SM la MFI dei pazienti con LDGL-CD3+ e CD3- è più alta rispetto a quella dei controlli (rispettivamente 63,88 vs 27,80 e 38,75 vs 11,20), così come anche la % dei pazienti LDGL-CD3+ rispetto ai controlli (37,88 vs 11,20) ($p < 0,05$). Questa caratteristica ci ha indotto a pensare che sia tramite questa chemochina che le DC esercitino un ruolo chiave nella LDGL, come sappiamo da dati di letteratura²¹.

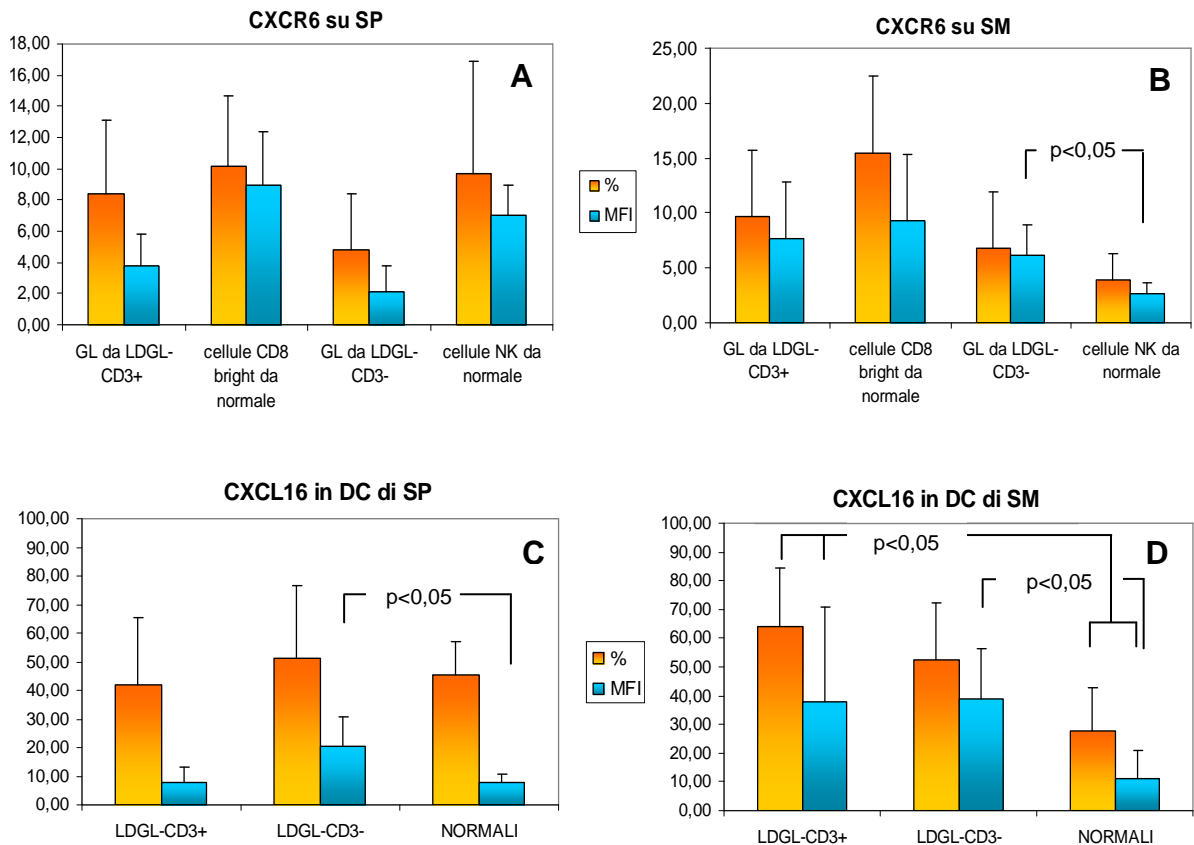


Figura 20. Istogrammi riportanti le medie della percentuale delle cellule che esprimono CXCR6 (%) (colonne in arancione) e dell'intensità di fluorescenza media, indice quantitativo d'espressione di CXCR6, (MFI) (colonne in azzurro). I valori sono stati ottenuti tramite lettura citofluorimetrica in pazienti con LDGL-CD3+, in quelli con LDGL-CD3- e in individui normali di controllo. Il grafico A riporta i risultati ottenuti su cellule da SP, il grafico B quelli ottenuti su cellule da SM. I risultati dei GL patologici devono essere messi a confronto con i loro corrispettivi normali, i GL-CD3+ con le cellule CD8 *bright*, i GL-CD3- con le cellule NK. L'unica differenza che risulta statisticamente significativa è tra l'MFI di CXCR6 su SM dei GL-CD3- e quello delle cellule NK normali (6,20 vs 2,67) ($p < 0,05$). Il grafico C riporta i risultati ottenuti su DC da SP. L'MFI di LDGL-CD3- risulta significativamente più alta di quella dei controlli (20,70 vs 7,60) ($p < 0,05$). Il grafico D riporta i dati ottenuti su DC da SM. % e MFI di LDGL-CD3+ risultano significativamente più alte rispetto ai valori riscontrati su normale (rispettivamente 63,88 vs 27,80 e 37,88 vs 11,20), così anche l'MFI di LDGL-CD3- rispetto al normale (38,75 vs 11,20) ($p < 0,05$).

Analisi dell'effetto di CXCL16 in forma solubile sulla mortalità cellulare

Il ruolo che si ritiene abbiano le DC si colloca nella fase di innesco e mantenimento del clone in espansione, stimolando i GL a proliferare, ma non è ancora stato chiarito il meccanismo attraverso cui esercitino questa influenza. Abbiamo pertanto voluto verificare un possibile coinvolgimento di CXCL16, vista la particolare espressione sulla superficie delle DC. Come primo obiettivo abbiamo voluto testare se CXCL16 in forma di chemochina solubile fosse in grado di modificare la vitalità dei GL. Abbiamo messo in coltura i PBMC da paziente e ne abbiamo valutato la percentuale di mortalità dei GL a diversi tempi nella condizione *alone* e in quella successiva ad aggiunta di CXCL16. Inoltre, abbiamo valutato gli

effetti di CXCL16 anche in condizioni di apoptosi cellulare indotta, per cui abbiamo messo in coltura le cellule aggiungendo l'agente apoptotico desametazone (DEX), da solo e insieme a CXCL16. Tutti i risultati sono stati confrontati con quelli ricavati da colture di cellule di individui sani. La vitalità è stata rilevata tramite misurazione dell'incorporazione cellulare del colorante Annessina, effettuata con lettura citofluorimetrica. Per ottenere i valori in modo selettivo sulle cellule d'interesse, ossia i GL per i pazienti e le cellule CD8 *bright* ed NK per gli individui sani, le cellule *target* sono state selezionate tramite marcatura con anticorpi specifici legati a fluorocromi. Gli esperimenti sono stati condotti su 4 pazienti con LDGL-CD3-, 9 pazienti con LDGL-CD3+ e 5 controlli normali.

Dai risultati è emerso che CXCL16 abbassa la percentuale di mortalità cellulare, quindi salva da apoptosi, in 5 casi su 9 degli LDGL-CD3+, in 2 su 4 degli LDGL-CD3- e in nessun controllo normale (figure 21 e 22). L'effetto sull'apoptosi si è verificato sia rispetto alla condizione *alone* che quella con desametazone e abbiamo quantificato che il valore medio della percentuale di salvataggio dalla mortalità era circa del 30%. Tutti i risultati sono stati uniformati esprimendo ogni valore in proporzione.

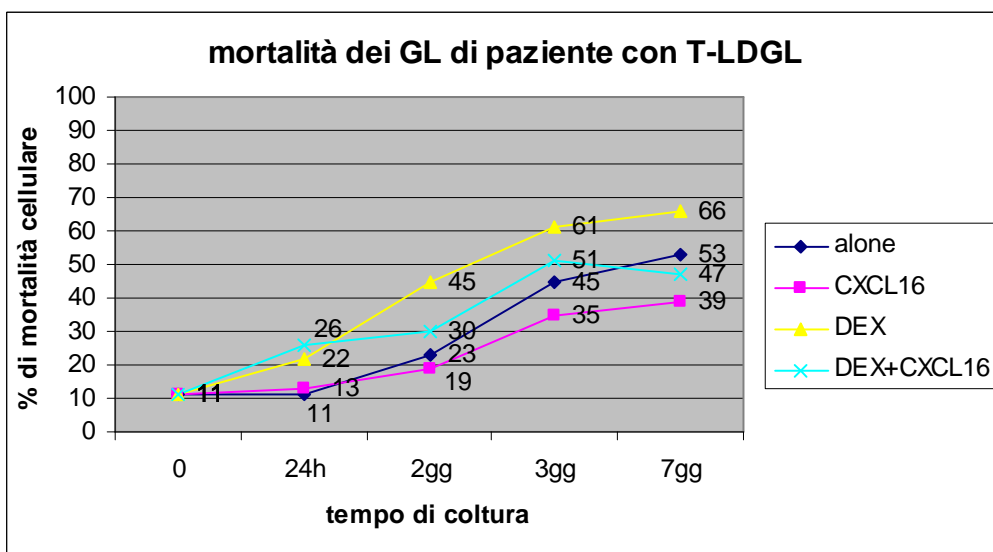


Figura 21. Istogramma rappresentativo dell'andamento della mortalità delle cellule da paziente messe in coltura in 4 diverse condizioni: *alone*, con CXCL16, con DEX, con CXCL16 e DEX. Le cellule sono state poi raccolte a diversi tempi (0, 1, 2, 3 e 7 giorni) e tramite lettura citofluorimetrica è stata valutata la percentuale di mortalità cellulare.

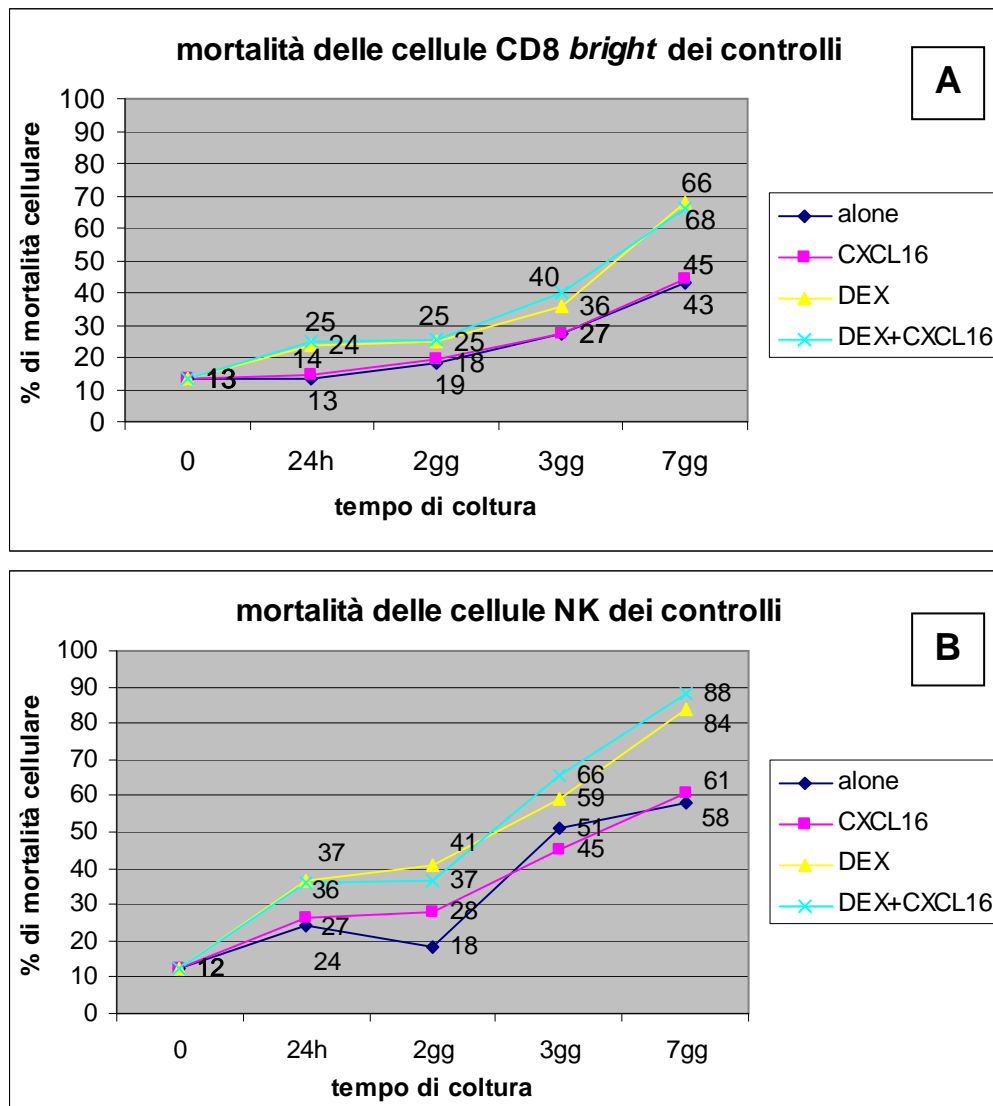


Figura 22. Istogramma rappresentativo dell'andamento della mortalità delle cellule da normale messe in coltura in 4 diverse condizioni: *alone*, con CXCL16, con DEX, con CXCL16 e DEX. Le cellule sono state poi raccolte a diversi tempi (0, 1, 2, 3 e 7 giorni) e tramite lettura citofluorimetrica è stata valutata la percentuale di mortalità cellulare. Il pannello A riporta i dati relativi alle cellule CD8 *bright*, controparte normale dei GL CD3+, e il pannello B riporta quelli relativi alle cellule NK, equivalenti normali dei GL CD3-.

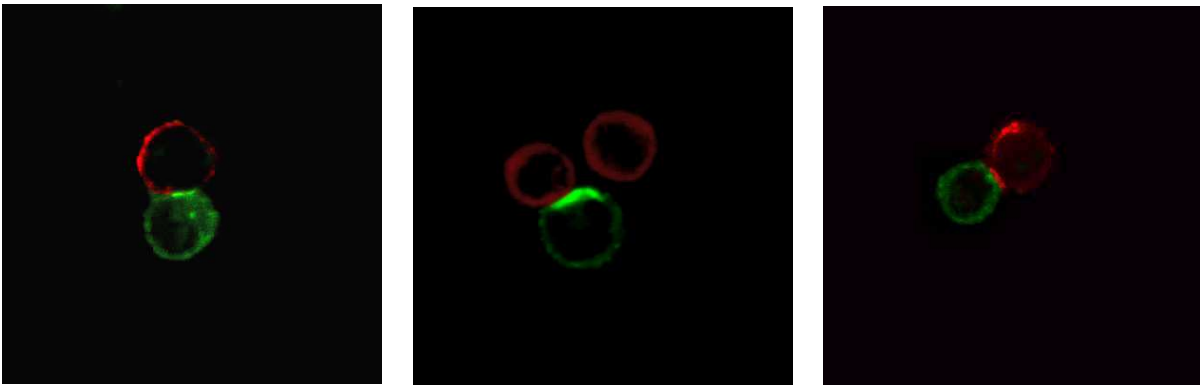
Analisi al microscopio confocale

Valutazione della presenza di CXCL16 nel sito di contatto tra DC e GL

Per capire ulteriormente se è tramite questa molecola che le DC influenzano gli eventi della LDGL, abbiamo voluto osservare se CXCL16, insieme a CXCR6, è coinvolta nel *cross-talk* tra DC e GL, che costituisce un passaggio chiave nello sviluppo della LDGL. A questo scopo, tramite microscopia confocale, siamo andati a verificare la loro presenza nella sinapsi immunitaria di contatto tra i due tipi cellulari. Per effettuare queste osservazioni, le DC e i GL sono stati messi in cocoltura e successivamente seminati sul vetrino. CXCL16 è stato marcato con il fluorocromo Alexa Fluor 488, che emette nel verde, e CXCR6 con il fluorocromo

Texas Red, che emette nel rosso. Dalle immagini raccolte con le cellule dei pazienti possiamo affermare che, a differenza dei controlli, quando erano visibili i due tipi cellulari in contatto di regola entrambe le citochine erano polarizzate nel sito di legame. Le immagini della figura 23 sono rappresentative dei risultati, che sono tuttavia ancora preliminari, di questa analisi condotta su cellule derivanti da SP. La prospettiva futura è quella di ampliare la casistica, per ora ristretta a 7 pazienti, e condurre le stesse osservazioni su cellule purificate da SM, dove CXCL16 è stata dimostrata *over*-espressa.

Paziente n.4



Controllo n.3

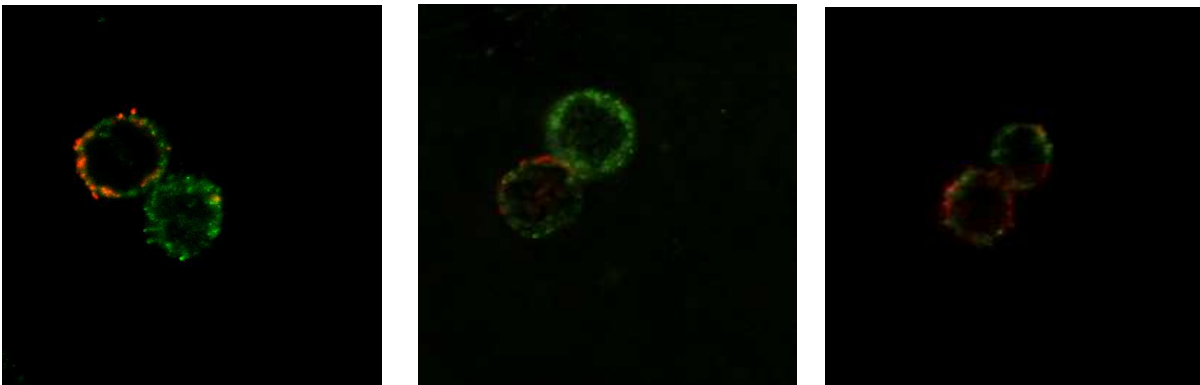


Figura 23. Immagini al microscopio confocale rappresentative del *cross-talk* tra DC e GL, successivo a cocoltura. In verde è marcato CXCL16 sulle pDC, in rosso CXCR6 sui GL. Si può osservare come nelle 3 immagini superiori vi sia un addensamento di fluorescenza nel sito di contatto dei due tipi cellulari da paziente. Le 3 immagini in basso sono quelle di un controllo rappresentativo.

Valutazione di CXCR6 all'interno dei Lipid Rafts

Inoltre, visto il coinvolgimento di CXCR6 nel *cross-talk* tra GL e DC abbiamo voluto osservare la localizzazione di CXCR6 sulla membrana cellulare dei GL. E' infatti riportato che nei pazienti con LDGL, vi sia un *subset*, all'interno del *pool* cellulare in espansione, costituito da GL particolarmente ricchi in *lipid rafts*⁸⁸. Si ipotizza siano tali cellule a essere responsabili del continuo rinnovo dei GL e, quindi, del mantenimento della proliferazione

cronica. Il nostro obiettivo è stato quello di verificare se CXCR6 si situa nelle zattere lipidiche di attivazione dei GL, ossia nei *lipid rafts*. I risultati sono stati ottenuti tramite la tecnica del *patching* e la successiva osservazione al microscopio confocale. Le immagini raccolte hanno indicato che CXCR6 risiede all'interno dei *lipid rafts* (figura 24), condizione che sarebbe stata evidenziata dalla sovrapposizione delle due marcature, verde per CXCR6 e rosso per GM1, proteina dei *lipid rafts*. Al contrario, abbiamo spesso riscontrato CXCR6 nel sito opposto dei *lipid rafts* sia nei pazienti che nei controlli.

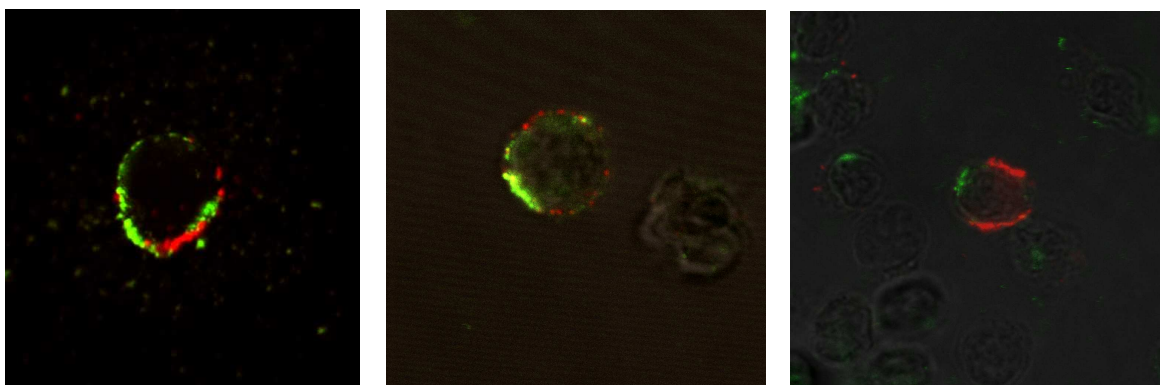


Figura 24. Immagini al microscopio confocale rappresentative sia dei pazienti che dei controlli dei GL processati con la tecnica del *patching*. In rosso sono marcati i *lipid rafts* e in verde CXCR6. Tra il gruppo di pazienti e quello dei controlli non si sono evidenziate differenze significative.

DISCUSSIONE

Sfruttando le peculiarità di ciascuna delle due forme di LDGL, abbiamo evidenziato delle caratteristiche che contribuiscono a descrivere questa patologia di cui l'eziologia e i meccanismi che la sviluppano sono ancora materia di dibattito.

I nostri primi dati riguardano la NK-LDGL sulla quale abbiamo condotto degli studi sulla famiglia dei KIR, che sono recettori NK esistenti in diverse forme alleliche, funzionalmente divise in KIR attivatori e inibitori. È la loro azione concertata che regola e indirizza l'attività delle cellule NK. I risultati emersi dalla analisi citofluorimetrica hanno evidenziato che le cellule NK patologiche della maggioranza dei pazienti erano caratterizzate dalla presenza dei recettori KIR e che, in più di un terzo di questi pazienti KIR-positivi, l'intera espansione delle cellule NK risultava omogeneamente caratterizzata da un determinato KIR. Grazie a questi risultati, abbiamo suggerito la natura monoclonale di queste proliferazioni di GL. Mentre nella forma T-LDGL la monoclonalità della linfoproliferazione è stata già accertata¹, nella forma NK rimaneva solo un'ipotesi non ancora confermata. I dati ottenuti ci hanno indotto, inoltre, a ritenere che particolari fenotipi rendano una cellula preferibilmente selezionabile a costituire il clone patologico. A questo proposito, in un precedente lavoro del nostro gruppo²⁴, avevamo evidenziato come le cellule esprimenti KIR di tipo attivatorio fossero più suscettibili a proliferare, essendo, nel pool di cellule NK, quelle che meglio si adattano ad una risposta a stimoli esterni. Si può quindi ipotizzare che uno dei primi eventi nello sviluppo di questo disordine linfoproliferativo sia rappresentato dal riconoscimento di cellule infette o tumorali da parte di cellule NK fenotipicamente caratterizzate da KIR di tipo attivatorio.

Successivamente, le nostre analisi si sono spostate a livello genotipico, per rilevare se nella regione dei KIR, diversa in ciascun individuo per numero e tipo di geni, si rispecchiasse la tendenza, osservata a livello fenotipico, dei GL patologici a esprimere KIR di tipo attivatorio. I dati raccolti ci hanno permesso di confermare questa ipotesi. Difatti, dalle analisi sul DNA, abbiamo riscontrato che le regioni KIR dei pazienti erano costituite da un più alto numero di geni rispetto ai controlli. Causa la relazione diretta tra numerosità genica della regione KIR e numero di geni KIR attivatori che la compongono, questo risultato indica che i genotipi dei pazienti sono ricchi di KIR attivatori. Da sottolineare, inoltre, che nella popolazione europea, secondo dati di letteratura, il genotipo KIR più frequente è quello a basso contenuto genico, corrispondente a omozigosi per l'aplotipo A, genotipo di carattere inibitorio. L'osservazione del contenuto genico di ciascun paziente ha invece delineato la

manca di questo genotipo a favore del gruppo di genotipi B, di carattere attivatorio. Inoltre, abbiamo riscontrato corredi genici ricorrenti ed esclusivi nel gruppo dei pazienti, che, tenendo conto della bassa probabilità che due persone condividano la stessa regione KIR, indica la possibilità che esistano genotipi caratteristici dei pazienti affetti da NK-LDGL. I risultati complessivi avvalorano l'ipotesi che vi sia una predisposizione genetica che favorisce lo sviluppo della NK-LDGL, supportando l'idea che la presenza di molteplici geni codificanti KIR attivatori potrebbe portare ad una maggiore sensibilità delle cellule NK a sviluppare una proliferazione patologica. L'importanza riscontrata dallo studio genotipico dei pazienti, insieme ad un ampliamento della casistica, potrebbe portare ad adottare questo tipo d'osservazione nella diagnostica della NK-LDGL.

Gli interessanti risultati ottenuti dallo studio dei genotipi KIR ci hanno portato, in un secondo momento, ad analizzare il meccanismo di controllo dell'espressione genica di questi recettori. Come primo passo, abbiamo valutato l'espressione dei KIR 3DL1 e 3DS1. In precedenza, infatti, avevamo evidenziato la tendenza delle cellule patologiche all'espressione del recettore attivatorio, rispetto al corrispondente inibitorio, ipotizzando il coinvolgimento del KIR3DS1 nello sviluppo della NK-LDGL²⁴.

L'analisi di espressione nelle cellule NK dei pazienti ha dimostrato che il recettore attivatorio KIR3DS1 è sempre espresso, qualora il gene sia presente, confermando i dati immunofenotipici ottenuti dal nostro studio precedente²⁴. Questo risultato, tuttavia, non si discosta in modo significativo dalla frequenza di espressione rilevata nelle cellule NK dei controlli. L'aspetto più interessante di questa analisi è emerso dalla valutazione dei risultati relativi all'allele inibitorio KIR3DL1: infatti, comparando tra loro i dati del gruppo dei pazienti e del gruppo dei controlli è stata evidenziata, nei primi, la significativa assenza di espressione del KIR3DL1 ($p < 0,05$). Da questi dati possiamo formulare l'ipotesi che l'associazione di una predominante espressione di recettori di tipo attivatorio e di una completa mancanza di KIR inibitori possa essere uno dei meccanismi alla base della patogenesi della LDGL. Nel nostro laboratorio abbiamo cercato di capire il possibile meccanismo della *down*-regolazione del recettore inibitorio, prendendo in esame la metilazione del DNA, considerato il principale meccanismo che regola la trascrizione e il silenziamento genico. I nostri risultati sul *pattern* di metilazione relativo al promotore dell'allele KIR3DL1 hanno evidenziato che nel promotore dei pazienti vi è una maggiore frequenza di metilazione rispetto a quella dei controlli ($p < 0,05$). Questi dati suggeriscono che il principale meccanismo di regolazione dell'espressione dei recettori KIR sia di tipo trascrizionale e che, di conseguenza, eventi in grado di modulare la trascrizione siano cruciali

nello sviluppo di questa patologia. Le cause determinanti questa alterazione trascrizionale potrebbero essere molteplici; studi preliminari condotti nel nostro laboratorio escludono dalle possibilità un coinvolgimento degli enzimi della famiglia delle DNMT, principali effettori della metilazione. Le potenziali prospettive future si indirizzeranno ad analizzare l'espressione di altre coppie di recettori KIR inibitorio/attivatorio e alla ricerca di mutazioni nelle sequenze coinvolte in modo specifico nella regolazione della trascrizione dei geni KIR.

Sulla LDGL di forma T i nostri risultati si inseriscono nello studio del *pathway* molecolare JAK/STAT, di cui esistono già diversi dati di letteratura^{20,51}, che riportano nei pazienti un aberrante *signaling* causato da un eccesso della proteina STAT3 in forma attivata. Nel nostro laboratorio abbiamo analizzato uno dei principali meccanismi che dovrebbero regolare questa cascata di segnale, rappresentato dalle proteine inibitrici del segnale citochinico, le proteine SOCS. Precisamente, abbiamo focalizzato la nostra attenzione su SOCS3, proteina citoplasmatica inibitrice specifica di STAT3 tramite un circuito a *feedback* negativo. La sua trascrizione è, infatti, indotta da STAT3 e la sua funzione è quella di inibire JAK, che di conseguenza blocca l'attivazione e la trascrizione di STAT3. STAT3, essendo un attivatore di trascrizione di molecole chiave per la crescita e proliferazione cellulare, nella sua forma costitutivamente attiva e in quantità eccedenti, si comporta da oncogene. SOCS3, vista la sua funzione inibitrice, funge da oncosoppressore. La proteina SOCS3 è stata riportata essere coinvolta in diverse patologie ematologiche, dove non riesce a svolgere la sua funzione protettiva^{50,59}. I risultati da noi ottenuti hanno rilevato che SOCS3 nella T-LDGL è presente in quantità esigue e sembra non contrastare l'alta espressione di STAT3; pertanto, anche nella malattia linfoproliferativa oggetto del nostro studio, SOCS3 non si comporta da oncosoppressore, bensì da protettore delle cellule tumorali. Infatti, dalle nostre analisi SOCS3 nei GL dei pazienti è presente a bassi livelli trascrizionali, ossia in una quantità che è caratteristica delle cellule quiescenti e non di quelle in attiva crescita e proliferazione dove sono riscontrabili alti livelli di STAT3 attivato come riscontrato peraltro nei GL patologici. Inoltre, i nostri risultati hanno evidenziato che SOCS3, pur manifestando risposte fisiologiche in risposta a stimoli citochinici, quali l'IL-2 e l'IL-15, ha dimostrato di non essere influenzabile dall'IL-6, che stimola la trascrizione di STAT3 e di conseguenza la sua stessa espressione. Possiamo supporre, quindi, che SOCS3 non ricopra la sua specifica funzione nella T-LDGL, e si dimostra inattiva a questo specifico stimolo citochinico. L'aberrante *signaling* dei GL-CD3+ serve come esempio che l'attivazione patologica di una via di segnale non è necessariamente dovuta ad un'*over*-espressione dei componenti della cascata, ma anche dalla perdita di fattori inibitori richiesti per l'equilibrio omeostatico dinamico.

Infine, i nostri risultati contribuiscono ad aggiungere determinanti dettagli sul *cross-talk* tra DC e GL nella LDGL (sia NK che T). È già riportato in letteratura che le DC abbiano un ruolo nell'innescare della malattia e nel mantenimento del clone patologico nel tempo. Si ipotizza, infatti, che le DC intervengano nel presentare il probabile agente esogeno, presumibilmente virale, che stimola inizialmente la proliferazione dei GL. Infatti, i GL patologici presentano un fenotipo caratteristico di cellule citotossiche mature. A questo proposito abbiamo recentemente dimostrato che i GL-CD3⁺ sono di regola dotati sulla loro superficie cellulare di recettori citotossici, che suggerisce che alla base della T-LDGL vi sia una risposta immunitaria di tipo citotossico nei confronti di un antigene che funge da stimolo antigenico cronico¹⁸. Come successiva ipotesi del ruolo delle DC, si pensa che esse siano responsabili della produzione di citochine capaci di mantenere il clone in espansione. Sul protrarsi dell'esistenza del clone nel SP dei pazienti vi è un'ulteriore ipotesi, formulata recentemente dal gruppo di Vitale (dati non ancora pubblicati), che la LDGL non sia altro che uno stato infiammatorio di cui non vi sia risoluzione finale, la cui causa deriva da un'alterazione del normale dialogo che dovrebbe intercorrere tra DC e GL, gli uni come APC e gli altri come effettori della risposta immunitaria. È stato quindi di grande interesse studiare espressione e funzione delle proteine che potrebbero essere mediatrici del colloquio tra DC e GL. I primi dati raccolti hanno evidenziato la presenza di quantità elevate di CXCL16 sulla superficie delle DC isolate da paziente, quando normalmente essa ha un'espressione costitutiva molto bassa. Questo dato ha evidenziato una peculiarità delle DC dei pazienti e ci ha fatto ipotizzare una possibile importanza di questa chemochina nel *cross-talk* con i GL, visto che il suo recettore specifico è CXCR6, presente sui GL. Il fatto che CXCL16 normalmente sia *up*-regolata solo durante gli stati infiammatori conferma che nella LDGL sia in corso una risposta immunitaria. Da sottolineare che l'*over*-espressione di CXCL16 è stata riscontrata soprattutto a livello delle DC plasmocitoidi del midollo osseo dei pazienti e questo avvalorava l'ipotesi, da noi precedentemente formulata²¹, che il sito di contatto tra DC e GL, che stimola la proliferazione, avvenga proprio nel midollo osseo e solo in un secondo tempo i GL attivati migrino nel SP.

Successivamente, sapendo che in alcuni tipi di cellule e in diverse forme tumorali CXCL16 ha manifestato, tramite il legame a CXCR6, effetti di stimolazione alla proliferazione cellulare delle cellule *target*, abbiamo ritenuto interessante valutare se CXCL16 in forma solubile avesse qualche influenza sulla vitalità dei GL da paziente messe in coltura *alone* o sotto induzione apoptotica. I nostri risultati hanno fatto emergere che in diversi pazienti l'aggiunta di CXCL16 alla coltura abbassava la percentuale di apoptosi dei GL,

risultato mai riscontrato sui controlli analizzati, dandoci la possibilità di ipotizzare che questa chemochina rilasciata dalle DC ricopra un ruolo nel mantenere il clone patologico in espansione. Infine, i dati raccolti dalle immagini al microscopio confocale di coculture tra GL e DC da pazienti e controlli ci hanno permesso di osservare che le due proteine sono presenti abbondantemente e che lì dove si riscontra il *cross-talk* tra i due tipi cellulari le due citochine sono polarizzate verso il sito di contatto. Questi dati suggeriscono che siano CXCL16 e CXCR6 che mediano il contatto tra DC e GL e che tramite esse intercorra il segnale di proliferazione e sopravvivenza delle cellule patologiche. L'insieme di questi ultimi dati ci permettono di ipotizzare che le DC svolgano il loro ruolo chiave nello sviluppo della LDGL tramite la chemochina CXCL16.

In conclusione, i dati raccolti finora su entrambe le forme di LDGL portano nuove conferme a diverse linee di ricerca ed aprono nuove prospettive di approfondimento, contribuendo a costruire un quadro patologico che assomiglia sempre di più ad uno stato infiammatorio in cui si aggiungono alterazioni intrinseche ai GL proliferanti.

BIBLIOGRAFIA

1. Zambello R, Semenzato G. Large granular lymphocytosis. *Haematologica*. 1998;83:936-942.
2. Sokol L, Loughran TP, Jr. Large granular lymphocyte leukemia. *Oncologist*. 2006;11:263-273.
3. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev*. 2006;20:123-137.
4. Loughran TP, Jr. Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood*. 1993;82:1-14.
5. Phillips JH, Lanier LL. Lectin-dependent and anti-CD3 induced cytotoxicity are preferentially mediated by peripheral blood cytotoxic T lymphocytes expressing Leu-7 antigen. *J Immunol*. 1986;136:1579-1585.
6. Tefferi A, Li CY, Witzig TE, Dhodapkar MV, Okuno SH, Phyliky RL. Chronic natural killer cell lymphocytosis: a descriptive clinical study. *Blood*. 1994;84:2721-2725.
7. Blanchong CA, Olshefski R, Kahwash S. Large granular lymphocyte leukemia: case report of chronic neutropenia and rheumatoid arthritis-like symptoms in a child. *Pediatr Dev Pathol*. 2001;4:94-99.
8. Kawa-Ha K, Ishihara S, Ninomiya T, et al. CD3-negative lymphoproliferative disease of granular lymphocytes containing Epstein-Barr viral DNA. *J Clin Invest*. 1989;84:51-55.
9. Semenzato G, Zambello R, Starkebaum G, Oshimi K, Loughran TP, Jr. The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis. *Blood*. 1997;89:256-260.
10. Kannourakis G, Begley CG, Johnson GR, Werkmeister JA, Burns GF. Evidence for interactions between monocytes and natural killer cells in the regulation of in vitro hemopoiesis. *J Immunol*. 1988;140:2489-2494.
11. Koizumi S, Seki H, Tachinami T, et al. Malignant clonal expansion of large granular lymphocytes with a Leu-11+, Leu-7- surface phenotype: in vitro responsiveness of malignant cells to recombinant human interleukin 2. *Blood*. 1986;68:1065-1073.
12. Oshimi K. Lymphoproliferative disorders of natural killer cells. *Int J Hematol*. 1996;63:279-290.
13. Zambello R, Semenzato G. Natural killer receptors in patients with lymphoproliferative diseases of granular lymphocytes. *Semin Hematol*. 2003;40:201-212.

14. Suzuki R, Suzumiya J, Nakamura S, et al. Aggressive natural killer-cell leukemia revisited: large granular lymphocyte leukemia of cytotoxic NK cells. *Leukemia*. 2004;18:763-770.
15. Alekshun TJ, Sokol L. Diseases of large granular lymphocytes. *Cancer Control*. 2007;14:141-150.
16. Martin MP, Gao X, Lee JH, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet*. 2002;31:429-434.
17. Smith HR, Heusel JW, Mehta IK, et al. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:8826-8831.
18. Baesso I, Pavan L, Boscaro E, et al. T-cell type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes (LDGL) is equipped with a phenotypic pattern typical of effector cytotoxic cells. *Leuk Res*. 2007;31:371-377.
19. Kothapalli R, Bailey RD, Kusmartseva I, Mane S, Epling-Burnette PK, Loughran TP, Jr. Constitutive expression of cytotoxic proteases and down-regulation of protease inhibitors in LGL leukemia. *Int J Oncol*. 2003;22:33-39.
20. Schade AE, Wlodarski MW, Maciejewski JP. Pathophysiology defined by altered signal transduction pathways: the role of JAK-STAT and PI3K signaling in leukemic large granular lymphocytes. *Cell Cycle*. 2006;5:2571-2574.
21. Zambello R, Berno T, Cannas G, et al. Phenotypic and functional analyses of dendritic cells in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes (LDGL). *Blood*. 2005;106:3926-3931.
22. Zambello R, Facco M, Trentin L, et al. Interleukin-15 triggers the proliferation and cytotoxicity of granular lymphocytes in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood*. 1997;89:201-211.
23. Greer JP, Kinney MC, Loughran TP, Jr. T cell and NK cell lymphoproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2001:259-281.
24. Zambello R, Falco M, Della Chiesa M, et al. Expression and function of KIR and natural cytotoxicity receptors in NK-type lymphoproliferative diseases of granular lymphocytes. *Blood*. 2003;102:1797-1805.
25. Middleton D, Curran M, Maxwell L. Natural killer cells and their receptors. *Transpl Immunol*. 2002;10:147-164.
26. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*. 1997;7:739-751.

27. Chan HW, Kurago ZB, Stewart CA, et al. DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J Exp Med.* 2003;197:245-255.
28. Moretta L, Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 2004;16:626-633.
29. Seliger B, Ritz U, Ferrone S. Molecular mechanisms of HLA class I antigen abnormalities following viral infection and transformation. *Int J Cancer.* 2006;118:129-138.
30. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev.* 2002;190:40-52.
31. Shilling HG, Young N, Guethlein LA, et al. Genetic control of human NK cell repertoire. *J Immunol.* 2002;169:239-247.
32. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity.* 1997;7:753-763.
33. Uhrberg M, Parham P, Wernet P. Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics.* 2002;54:221-229.
34. Hershberger KL, Shyam R, Miura A, Letvin NL. Diversity of the killer cell Ig-like receptors of rhesus monkeys. *J Immunol.* 2001;166:4380-4390.
35. Faure M, Long EO. KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol.* 2002;168:6208-6214.
36. Selvakumar A, Steffens U, Dupont B. NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains. *Tissue Antigens.* 1996;48:285-294.
37. Gomez-Lozano N, Gardiner CM, Parham P, Vilches C. Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. *Immunogenetics.* 2002;54:314-319.
38. Uhrberg M. The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. *Eur J Immunol.* 2005;35:10-15.
39. Gardiner CM, Guethlein LA, Shilling HG, et al. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. *J Immunol.* 2001;166:2992-3001.
40. Carr WH, Rosen DB, Arase H, Nixon DF, Michaelsson J, Lanier LL. Cutting Edge: KIR3DS1, a gene implicated in resistance to progression to AIDS, encodes a DAP12-

- associated receptor expressed on NK cells that triggers NK cell activation. *J Immunol.* 2007;178:647-651.
41. Santourlidis S, Trompeter HI, Weinhold S, et al. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J Immunol.* 2002;169:4253-4261.
 42. Chan MF, Liang G, Jones PA. Relationship between transcription and DNA methylation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000;249:75-86.
 43. Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science.* 1975;187:226-232.
 44. Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet.* 1975;14:9-25.
 45. Moretta A. The dialogue between human natural killer cells and dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 2005;17:306-311.
 46. Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol.* 2007;178:2623-2629.
 47. Cooney RN. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock.* 2002;17:83-90.
 48. Krebs DL, Hilton DJ. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells.* 2001;19:378-387.
 49. Zhang Q, Wang HY, Woetmann A, Raghunath PN, Odum N, Wasik MA. STAT3 induces transcription of the DNA methyltransferase 1 gene (DNMT1) in malignant T lymphocytes. *Blood.* 2006;108:1058-1064.
 50. Schuringa JJ, Wierenga AT, Kruijer W, Vellenga E. Constitutive Stat3, Tyr705, and Ser727 phosphorylation in acute myeloid leukemia cells caused by the autocrine secretion of interleukin-6. *Blood.* 2000;95:3765-3770.
 51. Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, et al. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest.* 2001;107:351-362.
 52. Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, et al. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:2071-2076.
 53. Yu CR, Mahdi RM, Ebong S, Vistica BP, Gery I, Ekwuagu CE. Suppressor of cytokine signaling 3 regulates proliferation and activation of T-helper cells. *J Biol Chem.* 2003;278:29752-29759.

54. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res.* 2002;4 Suppl 3:S233-242.
55. Dalpke AH, Opper S, Zimmermann S, Heeg K. Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs. *J Immunol.* 2001;166:7082-7089.
56. Sasaki A, Yasukawa H, Suzuki A, et al. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells.* 1999;4:339-351.
57. Lu Y, Fukuyama S, Yoshida R, et al. Loss of SOCS3 gene expression converts STAT3 function from anti-apoptotic to pro-apoptotic. *J Biol Chem.* 2006;281:36683-36690.
58. Nicholson SE, De Souza D, Fabri LJ, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:6493-6498.
59. Sakai I, Takeuchi K, Yamauchi H, Narumi H, Fujita S. Constitutive expression of SOCS3 confers resistance to IFN-alpha in chronic myelogenous leukemia cells. *Blood.* 2002;100:2926-2931.
60. Moretta L, Bottino C, Ferlazzo G, et al. Surface receptors and functional interactions of human natural killer cells: from bench to the clinic. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:2139-2146.
61. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med.* 2002;195:343-351.
62. Lamy T, Loughran TP, Jr. Current concepts: large granular lymphocyte leukemia. *Blood Rev.* 1999;13:230-240.
63. Epling-Burnette PK, Bai F, Wei S, et al. ERK couples chronic survival of NK cells to constitutively activated Ras in lymphoproliferative disease of granular lymphocytes (LDGL). *Oncogene.* 2004;23:9220-9229.
64. Loughran TP, Jr., Hadlock KG, Yang Q, et al. Seroreactivity to an envelope protein of human T-cell leukemia/lymphoma virus in patients with CD3- (natural killer) lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood.* 1997;90:1977-1981.
65. Hart DN, Baker BW, Inglis MJ, et al. Epstein-Barr viral DNA in acute large granular lymphocyte (natural killer) leukemic cells. *Blood.* 1992;79:2116-2123.

66. Zambello R, Loughran TP, Jr., Trentin L, et al. Serologic and molecular evidence for a possible pathogenetic role of viral infection in CD3-negative natural killer-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Leukemia*. 1995;9:1207-1211.
67. Ishihara S, Okada S, Wakiguchi H, Kurashige T, Hirai K, Kawa-Ha K. Clonal lymphoproliferation following chronic active Epstein-Barr virus infection and hypersensitivity to mosquito bites. *Am J Hematol*. 1997;54:276-281.
68. Zambello R, Cassatella MA, Trentin L, et al. Different mechanisms of activation of proliferating CD3+ cells in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Leukemia*. 1991;5:942-950.
69. Ludwig A, Weber C. Transmembrane chemokines: versatile 'special agents' in vascular inflammation. *Thromb Haemost*. 2007;97:694-703.
70. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*. 1997;385:640-644.
71. Tabata S, Kadowaki N, Kitawaki T, et al. Distribution and kinetics of SR-PSOX/CXCL16 and CXCR6 expression on human dendritic cell subsets and CD4+ T cells. *J Leukoc Biol*. 2005;77:777-786.
72. Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE, Cyster JG. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol*. 2000;1:298-304.
73. Ruth JH, Haas CS, Park CC, et al. CXCL16-mediated cell recruitment to rheumatoid arthritis synovial tissue and murine lymph nodes is dependent upon the MAPK pathway. *Arthritis Rheum*. 2006;54:765-778.
74. Agostini C, Cabrelle A, Calabrese F, et al. Role for CXCR6 and its ligand CXCL16 in the pathogenesis of T-cell alveolitis in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:1290-1298.
75. Chandrasekar B, Bysani S, Mummidi S. CXCL16 signals via Gi, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, I kappa B kinase, and nuclear factor-kappa B and induces cell-cell adhesion and aortic smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem*. 2004;279:3188-3196.
76. Deng HK, Unutmaz D, KewalRamani VN, Littman DR. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature*. 1997;388:296-300.
77. Liao F, Alkhatib G, Peden KW, Sharma G, Berger EA, Farber JM. STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. *J Exp Med*. 1997;185:2015-2023.

78. Unutmaz D, Xiang W, Sunshine MJ, Campbell J, Butcher E, Littman DR. The primate lentiviral receptor Bonzo/STRL33 is coordinately regulated with CCR5 and its expression pattern is conserved between human and mouse. *J Immunol.* 2000;165:3284-3292.
79. Geissmann F, Cameron TO, Sidobre S, et al. Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS Biol.* 2005;3:e113.
80. Gaida MM, Gunther F, Wagner C, et al. Expression of the CXCR6 on polymorphonuclear neutrophils in pancreatic carcinoma and in acute, localized bacterial infections. *Clin Exp Immunol.* 2008;154:216-223.
81. Sun JY, Gaidulis L, Miller MM, et al. Development of a multiplex PCR-SSP method for Killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping. *Tissue Antigens.* 2004;64:462-468.
82. Wu Y, Strawn E, Basir Z, Halverson G, Guo SW. Aberrant expression of deoxyribonucleic acid methyltransferases DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2007;87:24-32.
83. Haider AS, Peters SB, Kaporis H, et al. Genomic analysis defines a cancer-specific gene expression signature for human squamous cell carcinoma and distinguishes malignant hyperproliferation from benign hyperplasia. *J Invest Dermatol.* 2006;126:869-881.
84. Carrington M NP. The Kir Gene Cluster. MD: National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. 2003.
85. Tefferi A, Greipp PR, Leibson PJ, Thibodeau SN. Demonstration of clonality, by X-linked DNA analysis, in chronic natural killer cell lymphocytosis and successful therapy with oral cyclophosphamide. *Leukemia.* 1992;6:477-480.
86. Chan HW, Miller JS, Moore MB, Lutz CT. Epigenetic control of highly homologous killer Ig-like receptor gene alleles. *J Immunol.* 2005;175:5966-5974.
87. Vilkaitis G, Suetake I, Klimasauskas S, Tajima S. Processive methylation of hemimethylated CpG sites by mouse Dnmt1 DNA methyltransferase. *J Biol Chem.* 2005;280:64-72.
88. Zambello R, Cabrelle A, Trentin L, Agostini C, Semenzato G, Viola A. The raft marker GM1 identifies functional subsets of granular lymphocytes in patients with CD3+ lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Leukemia.* 2004;18:771-776.

ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI

Pubblicazioni:

- “Genotypic evaluation of killer immunoglobulin-like receptors in NK-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes”. Scquizzato E, **Teramo A**, Miorin M, Facco M, Piazza F, Noventa F, Trentin L, Agostini C, Zambello R, Semenzato G. *Leukemia*. 2007; 21(5): 1060-9.
- “CXCR6-CXCL16 interaction in the pathogenesis of Juvenile Idiopathic Arthritis”. Martini G, Cabrelle A, Calabrese F, Carraro S, Scquizzato E, **Teramo A**, Facco M, Zulian F, Agostini C. *Clin. Immunol.* 2008; 129(2): 268-76.

Abstracts relativi a congressi:

- “Hematopoietic lineage cell specific protein 1 (HS1) is a new prognostic marker and is involved in cell growth of B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia”. F. Frezzato, Gattazzo C, Brunati A, Frasson M, Martini V, Scquizzato E, Carraro S, **Teramo A**, Miorin M, Zambello R, Semenzato G, Trentin L. 10th International Conference on Malignant Lymphoma, June 8-11, 2005, Lugano, Switzerland.
- “Analysis of KIR Framework Loci in patients with NK-type Lymphoproliferative Disease of Granular Lymphocytes (LDGL)”. Zambello R, Scquizzato E, **Teramo A**, Facco M, Pavan L, Miorin M, Trentin L, Agostini C, Semenzato G. 47th annual meeting of American Society of Hematology, December 10-13, 2005, Atlanta, Georgia.
- “KIR/HLA-I mismatching and risk of relapse in pediatric patients undergoing non- haploidentical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation”. Scquizzato E, **Teramo A**, Baesso I, Albergoni MP, Messina C, Miorin M, Facco M, Agostini C, Varotto S, Destro R, Gazzola MV, Cesaro S, Semenzato G, Zambello R, Trentin L. 5th meeting of the EMBT data management group, March 19-22, 2006, Hamburg, Germany.

- “KIR/HLA-I mismatching and risk of relapse in pediatric patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation”. Trentin L, Scquizzato E, **Teramo A**, Baesso I, Albergoni MP, Boscaro E, Ave E, Messina C, Miorin M, Facco M, Varotto S, Gazzola MV, Cesaro S, Semenzato G, Zambello R, Trentin L. 12th Congress of the European Hematology Association, June 7-10, 2007, Vienna, Austria.
- “TL1A/DR3 expression correlates with sarcoidosis activation state”. Gattazzo C, Cabrelle A, Frezzato F, **Teramo A**, Olivieri V, Facco M, Calabrese F, Cassatella M, Agostini C, Semenzato G. Prima giornata Federativa organizzata dalla Federazione Italiana tra le società di Immunologia, Allergologia e Immunologia Clinica (SIICA), 14 Ottobre, 2008, Firenze, Italia.
- “KIR/HLA-I mismatching predicts risk of relapse in pediatric patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation”. Scquizzato E, Zambello R, Baesso I, Varotto S, Albergoni MP, **Teramo A**, Boscaro E, Cesaro S, Pillon M, Calore E, Gazzola MV, Semenzato G, Messina C, Trentin L. 50th annual meeting of American Society of Hematology, December 6-9, 2008, San Francisco, California.

Lavori inviati a riviste:

- “KIR/HLA-I mismatching and risk of relapse in pediatric patients undergoing non-haploidentical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation”. Scquizzato E, Zambello R, Baesso I, Varotto S, Albergoni MP, **Teramo A**, Boscaro E, Cesaro S, Pillon M, Calore E, Gazzola MV, Semenzato G, Messina C, Trentin L. Submitted.
- “Inhibitory KIR3DL1 signal down regulation in patients with NK-type Lymphoproliferative disease of granular lymphocytes”. Gattazzo C, Miorin M, Scquizzato E, **Teramo A**, Cabrelle A, Balsamo M, Agostini C, Vendrame E, Albergoni MP, Trentin L, Vitale M, Semenzato G, Zambello R. Submitted.