

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna
Facoltà di Medicina e Chirurgia

DOTTORATO DI RICERCA

Scienze Chirurgiche-progetto N.3
“Scienze medico-chirurgiche gastroenterologiche e dei
trapianti”

Ciclo XXIII

**Settore scientifico-disciplinare di afferenza: MED/09 MEDICINA
INTERNA**

RUOLO DEI GENI NOD2, IL23R ED ATG16L IN UNA
POPOLAZIONE
DI PAZIENTI SICILIANI CON MALATTIA DI CROHN

Presentata da: Dott. Ruggeri Rosario Fabio

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Massimo Campieri

Prof. Mario Cottone

Esame finale anno 2011

INDICE

Introduzione	pag. 5
La malattia di Crohn	pag. 7
Manifestazioni cliniche: intestinali ed extraintestinali	pag. 10
La malattia di Crohn: malattia multifattoriale	pag. 14
Le popolazioni cellulari nella patologia	pag. 25
I mediatori infiammatori: le citochine	pag. 29
Aspetti genetici nella malattia di crohn	pag. 35
il nod2 (nucleotide oligomerization domain 2)	pag. 40
Il ruolo dell'il23 nella patogenesi delle IBD	pag. 46
Il Recettore dell'IL23 (IL23-R)	pag. 52
Il processo autofagico e l'atg16l1 nella malattia	pag. 59
Scopo della tesi	pag.73
Materiali e metodi	pag.76
Campionamento	pag.76
Estrazione del DNA genomico	pag.77
Analisi Genetiche	pag. 80
PCR-RFLP (Restriction Fragment Polimorfism)	pag. 80
Sequenziamento genico	pag. 85
Ibridazione con il reverse dot blot	pag. 89
Risultati	pag. 91
Discussione	pag. 97
Bibliografia	pag. 102

INTRODUZIONE

La malattia di Crohn (Crohn Disease, CD) è una patologia infiammatoria cronica dell'apparato digerente, con andamento clinico ricorrente, e può interessare qualsiasi parte dello stesso, dalla bocca all'ano. La CD assieme alla Rettocolite Ulcerosa (UC), appartiene al gruppo delle malattie infiammatorie croniche dell'intestino (IBD) e i cui aspetti sono spesso multiformi e frequentemente di non facile gestione.

Fu descritta per la prima volta nel 1761 da Morgagni, il quale la definì una flogosi intestinale specifica; dal 1889 al 1931 scienziati come Dalziel, Weiner e Moschowitz si preoccuparono di descriverla più accuratamente, ma fu Crohn, che nel 1932 si fregiò del titolo di scopritore della patologia, denominata per l'appunto malattia di Crohn. L'interesse crescente per questa malattia è riconducibile prevalentemente ad alcuni motivi:

- L'incidenza del morbo di Crohn è in aumento; Infatti si è notato un significativo, rapido e progressivo aumento dei casi diagnosticati.
- La diagnosi precoce è fondamentale per recuperare un eventuale ritardo di crescita o complicanze cliniche che porterebbero ad eventuale intervento chirurgico.

- La presentazione clinica di queste malattie è spesso aspecifica; può essere confondibile con quella di altre sindromi infiammatorie o nascosta dietro una febbre di origine indeterminata (Ventura A., 1998).
- risultano esserci ancora molti punti oscuri da chiarire, quali L'eziologia, il ruolo e la natura di possibili alterazioni primitive del sistema immunitario etc..

LA MALATTIA DI CROHN

La malattia di Crohn è una patologia infiammatoria cronica con manifestazioni prevalentemente intestinali ma anche extraintestinali. Nella CD, l'infiammazione può coinvolgere qualsiasi tratto dell'apparato digerente, dalla bocca all'ano, e può interessare sia la mucosa che strati più profondi della parete gastro-intestinale. I pazienti con CD vengono classificati in diversi sottogruppi clinici sulla base di età di sviluppo della malattia, estensione della malattia, presentazione di manifestazioni extraintestinali, naturale decorso della malattia e risposta al trattamento farmacologico.

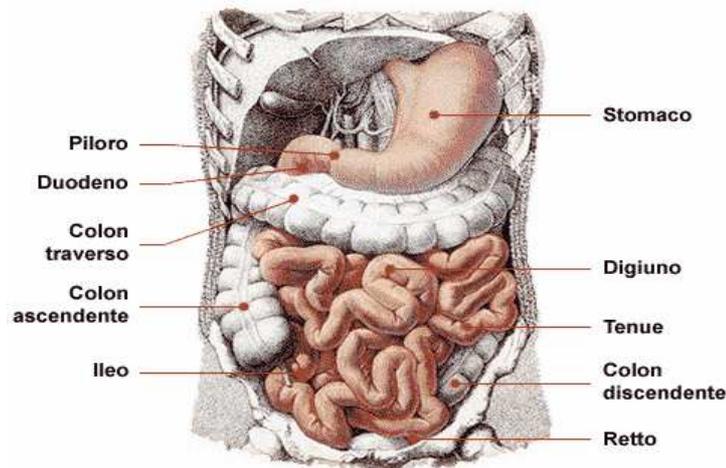


Fig. 1

Nel 1932, Burril B. Crohn, un medico americano, ha dato il suo nome alla malattia descrivendo 14 casi della malattia localizzata nella metà terminale dell'intestino tenue (ileo).

Si ritiene che la malattia esistesse ben prima l'inizio del secolo, poiché prima dell'arrivo della radiologia, l'intestino tenue era difficilmente esplorabile in assenza d'intervento chirurgico, era impossibile precisare, al momento dei disturbi, la natura delle lesioni intestinali, sia che fossero macroscopiche sia microscopiche. Certe descrizioni anatomiche e cliniche dell'antichità sono simili alla sintomatologia della malattia. Crohn e i suoi collaboratori hanno avuto il merito di osservare, nei 14 malati operati all'intestino tenue, l'origine e la comunanza delle lesioni del tessuto. La descrizione di queste lesioni fatta da Crohn era già abbastanza completa e poche novità sono intervenute in questo campo negli anni successivi. Molto in fretta, al contrario, ci si è accorti che le stesse anomalie istologiche potevano essere osservate in altri punti del tubo digerente. La possibile coesistenza di un'affezione dell'ileo con altre lesioni in uno stesso malato lasciava supporre che si trattasse di una sola malattia. Così, schematicamente, il quadro della malattia si è a poco a poco sviluppato fino ad arrivare alla definizione data all'inizio. Oggi grazie ai progressi delle tecniche radiologiche ed endoscopiche (esami durante i quali si possono prelevare frammenti della parete intestinale), la diagnosi della Malattia di Crohn può essere spesso fatta all'inizio della malattia, senza la necessità di un intervento chirurgico. La natura delle

manifestazioni cliniche della Malattia di Crohn dipende dalla sua localizzazione. Esistono manifestazioni sia intestinali ma anche manifestazioni extra-intestinali: nessuna però è specifica della Malattia di Crohn, cioè altre malattie possono scatenare dei sintomi identici, rendendo difficile il riconoscimento della malattia al suo inizio. Ciò che è, al contrario, tipico della Malattia di Crohn, è la sua modalità evolutiva. Essendo la localizzazione della CD il più delle volte intestinale, i sintomi più frequenti sono i dolori addominali e la diarrea. L'infiammazione dell'ano e/o della regione perianale è abbastanza peculiare della Malattia di Crohn. Questa localizzazione, abbastanza frequente, è all'origine di diverse complicazioni come fistole, fessure o ascessi.

LE MANIFESTAZIONI CLINICHE: INTESTINALI ED EXTRAINTESTINALI

L'insorgenza della malattia è correlata con l'alterazione dello stato generale di intensità variabile. Tipicamente la malattia insorge in giovani adulti con una storia di astenia, variabile perdita di peso, fastidio o dolore in fossa iliaca destra, inoltre possono essere riferiti febbricola da (37.5°C fino a 39°-40°C), anoressia, nausea e vomito. Possono nel contempo essere riscontrati un'anemia di lieve entità, una lieve o moderata leucocitosi e un aumento della velocità di eritrosedimentazione (VES). Diarrea e dolore addominale sono frequenti. La diminuzione dell'apporto alimentare, favorita dai dolori addominali, provoca una perdita di peso. Degli altri fattori possono concorrere all'apparizione di uno stato di denutrizione, come ad esempio i disturbi d'assorbimento. Questa denutrizione può essere globale per insufficienza d'apporto energetico, o calorica, ma predomina spesso per i protidi. Certe vitamine e minerali possono in alcuni casi mancare. Questa mancanza nutrizionale deve sempre essere ricercata e compensata, in quanto potrebbe causare un ritardo nella crescita nei bambini. Possono insorgere inoltre complicazioni intestinali come la stenosi localizzata solitamente nell'intestino tenue seguita, se non trattata, da occlusione intestinale per cui l'intervento chirurgico diviene

allora rapidamente indispensabile. Gli ascessi intra-addominali e le fistole, complicazioni caratteristiche della Malattia di Crohn, sono la conseguenza dell'evoluzione in profondità delle ulcerazioni intestinali che si estendono a tutto lo spessore della parete intestinale.

Il sopraggiungere di un cancro dell'intestino tenue o del colon è più frequente nei pazienti colpiti dalla Malattia di Crohn da più di 20 anni che nella popolazione normale, ma questa complicazione resta, fortunatamente, rarissima.

Le manifestazioni extra-intestinali più frequenti sono diverse come quelle di carattere articolare e le manifestazioni cutanee, oculari, epatobiliari, urinarie ed anche i calcoli renali. Le manifestazioni di carattere articolare si verificano nel 25% dei pazienti. Possono precedere di anni l'esordio della malattia intestinale e persistere anche dopo che ne sia stata ottenuta la remissione chirurgica o medica. Si distingue il reumatismo periferico che interessa le articolazioni degli arti (ginocchio, caviglia, spalla, ecc.) dal reumatismo assiale che concerne la colonna vertebrale e il bacino. L'aggravamento del reumatismo periferico è, spesso, simultaneo con quello della Malattia di Crohn mentre il reumatismo assiale ha tendenza ad evolvere per conto proprio indipendentemente dallo stato digestivo. vi è una significativa associazione con il fenotipo

HLAB27. Anche le manifestazioni cutanee appaiono con l'evolversi della Malattia di Crohn, si osservano in circa il 15% dei pazienti, la loro gravità è correlata al grado di attività della malattia intestinale. Le più frequenti tra queste sono l'eritema nodoso o il pioderma gangrenoso. Le manifestazioni oculari sono anch'esse contemporanee all'accentuarsi della malattia e possono provocare intolleranza alla luce, infiammazione dell'iride, o essere scoperte solo al momento di un esame oculistico. episclerite, irite ricorrente e uveite insorgono in circa il 5% dei pazienti e sono complicanze gravi della malattia. In generale la loro gravità coincide con quella della malattia intestinale; possono scomparire immediatamente dopo una colectomia. Le manifestazioni epatobiliari sono latenti, cioè non provocano alcun segno, ma possono essere scoperte attraverso esami di laboratorio come l'analisi istologica. La presenza di calcoli nella cistifellea è più frequente nei casi della Malattia di Crohn in cui è colpito l'ileo. In pazienti gravemente compromessi e in stato di malnutrizione vengono spesso riscontrate alterazioni delle transaminasi sieriche e della fosfatasi alcalina, come espressioni di epatite focale aspecifica o infiltrazione grassa del fegato. Fattori facilitanti lo sviluppo di steatosi epatica nei pazienti con malattia grave sono lo scarso apporto nutrizionale e spesso la concomitante terapia steroidea. Comunque tale

condizione non è progressiva e si risolve con la remissione della malattia. La pericolangite è caratterizzata istologicamente da flogosi degli spazi portali, proliferazione di qualche dotto biliare e fibrosi concentrica attorno ai dotti biliari. Non infrequentemente può svilupparsi una colangite sclerosante, un'inflammatione cronica interessante i dotti biliari intra ed extraepatica determinate un variabile grado di ostruzione delle vie biliari extraepatiche. Infine un'epatite cronica attiva autoimmune che può evolversi in cirrosi è stata osservata nella malattia di Crohn, anche se non è noto l'esatto rapporto esistente tra queste condizioni (Harrison, XIII Edizione).

Le manifestazioni urinarie possono essere d'origine diversa come una fistola enterovesicale. I calcoli renali sono più frequenti in caso di Malattia di Crohn con l'ileo colpito, poichè i grassi, mal assorbiti per la mancanza dei sali biliari fissano il calcio nell'intestino, impedendo la normale fissazione del calcio sull'ossalato d'origine alimentare, Impedendo la normale eliminazione dell'ossalato stesso e favorendo quindi la formazione di calcoli di ossalato. La formazione del calcolo è anche favorita da tutte le circostanze che scatenano una disidratazione in questa condizione.

LA MALATTIA DI CROHN: MALATTIA MULTIFATTORIALE

L'eziologia delle malattie infiammatorie croniche dell'intestino (IBD) non è ancora chiara. L'ipotesi attualmente più accreditata è che le IBD siano il risultato di una inappropriata ed esagerata risposta immune verso i normali costituenti della microflora intestinale mucosale residente, indotta verosimilmente da un agente esterno, in individui geneticamente predisposti.

I meccanismi patogenetici ipotizzati riguardano diversi aspetti:

Epidemiologia: dieta, farmaci, storia vaccinale e immunità acquisita nell'infanzia, variazioni stagionali, circostanze sociali.

Interfaccia ambiente/intestino: batteri intraluminali, muco epiteliale, funzione di barriera, rimodellamento epiteliale, interazione epitelio/ sistema immune.

Processi infiammatori: traduzione del segnale, citochine, interazione con il sistema immune.

Genetica: la regione IBD1 del cromosoma 16 (che contiene il gene di suscettibilità per la malattia di Crohn CARD 15/NOD2), ed i geni IBD3, IBD5, IL23R ed ATG16L.

Dagli studi di popolazioni, indubbiamente, emerge che la prevalenza delle IBD presenta una notevole differenziazione a

seconda di variabili geografiche e razziali. In questi casi possono essere proposte, schematicamente, tre spiegazioni:

1. La differenza dipende dal patrimonio genetico dei malati; in questo caso certi gruppi di popolazione sono “ereditariamente” predisposti a contrarre la malattia
2. La differenza dipende dall'ambiente, per esempio dalle abitudini alimentari; in questo caso un componente della dieta può essere il fattore scatenante della malattia.
3. Intervengono ambedue le ipotesi contemporaneamente.

Questi dati epidemiologici suggeriscono l'ipotesi che nello sviluppo di queste malattie possano svolgere un certo ruolo comune fattori genetici e ambientali e quindi che alla base di tali patologie vi sia una probabile ereditarietà di fattori non conosciuti unita ad una spiccata componente ambientale.

Le caratteristiche ereditarie di ogni individuo, sono determinate dal proprio corredo genetico, cioè dall'insieme di geni trasmessi dai genitori. Le malattie genetiche sono causate da alterazioni nel DNA di un individuo. Queste alterazioni del DNA possono essere ereditarie, in quanto si possono trasmettere alle generazioni successive. Quando avviene un cambiamento nelle sequenze di DNA che costituiscono il gene, questo può funzionare non correttamente per effetto della mutazione verificatasi.

Le malattie causate da difetti in un solo gene si dicono monogeniche, mentre se i geni alterati sono più di uno la malattia è poligenica.

Se a causare la malattia intervengono anche fattori ambientali, si parla di malattia multifattoriale. Nelle malattie multifattoriali l'ereditarietà è complessa e difficilmente prevedibile perché: non si eredita la malattia ma la predisposizione ad ammalarsi e la malattia è determinata da un insieme di fattori genetici e ambientali non sempre facilmente individuabili. Le malattie che vengono ereditate come caratteri multifattoriali sono molte, basti pensare al diabete mellito giovanile o alle malattie autoimmuni (lupus, artrite reumatoide, sclerosi multipla etc..)

Per quel che riguarda la Malattia di Crohn, certi fatti sono ben stabiliti e riconosciuti. La Malattia di Crohn è soprattutto frequente in America del nord e nel nord Europa (Scandinavia per esempio). È di frequenza intermedia nel sud Europa. È rara nella maggior parte delle altre regioni del mondo. La Malattia di Crohn è più frequente a livello urbano che a quello rurale. Esistono casi familiari di malattia (gemelli o fratelli e sorelle si ammalano entrambi, per esempio): La frequenza di questi casi è nettamente superiore a ciò che vorrebbero le leggi del caso, e ciò afferma il ruolo, almeno parziale, del patrimonio genetico.

Inoltre recentemente sono stati individuati dei geni di predisposizione alla malattia. I numerosi studi di replicazione (sul modello di quelli di Hugot et al, 2001), eseguiti anche nella popolazione italiana, hanno confermato un linkage soprattutto sul cromosoma 16 (IBD1) (Annese V. et al, 2003). Studi successivi hanno permesso, infine, di identificare, con metodi di positional cloning e linkage disequilibrium, il locus "IBD1", localizzato nella regione pericentromerica del cromosoma 16 (16q12) al cui interno si è visto trovarsi il gene denominato NOD2/CARD15.

Nonostante l'eziologia del CD rimanga ignota, sono state proposte diverse aree di possibile importanza eziologica, ma queste non hanno, per il momento, portato che a delle ipotesi che comprendono fattori familiari, genetici, infettivi, ambientali, immunologici e psicologici. I dati epidemiologici hanno orientato l'attenzione soprattutto verso le componenti ambientali (alimentare e infettiva) e genetiche. Queste principali ipotesi, che mettono in gioco dei fattori alimentari, immunologici o genetici, sono riassunte di seguito. Non esistono evidenze certe che fattori dietetici abbiano un ruolo nel CD, ma studi epidemiologici hanno evidenziato possibili associazioni con la dieta. I fattori alimentari sono stati all'origine delle prime teorie. La comparazione delle abitudini alimentari dei pazienti colpiti dalla Malattia di Crohn e quelle delle persone sane

ha mostrato certe differenze. Le inchieste realizzate hanno, tuttavia, portato a dei risultati contraddittori. Non ci sono attualmente spiegazioni scientifiche valide per rendere responsabile questa o quell'altra abitudine alimentare. Recentemente è stato ipotizzato un ruolo della crioconservazione alimentare (a temperature 0-10 °C) che può permettere la crescita di microrganismi a bassa patogenicità (tra cui alcune yersinie) potenzialmente rilevanti nella patogenesi della malattia di Crohn. Tra gli altri fattori ambientali a cui si fa riferimento c'è anche il fumo, che innalza di 3-4 volte il rischio di sviluppare la malattia oltre a causarne un decorso più aggressivo (Selby W. S. *et al.*, 2003). Il ruolo del tabacco è stato recentemente dimostrato, infatti il tabagismo attivo aumenta il rischio che la malattia compaia, soprattutto nelle donne. Il meccanismo dell'effetto nocivo del tabacco si manifesterebbe attraverso dei disturbi della micro circolazione nella parete intestinale.

Per quanto riguarda i fattori infettivi, non bisogna dimenticare il fatto certo che **la Malattia di Crohn non è contagiosa**. Le ricerche batteriologiche in questo ambito, inoltre, sono molto difficili da portare avanti perché il colon già in condizioni fisiologiche contiene un numero enorme di batteri (dell'ordine di 10000 miliardi) la cui maggior parte non può vivere che in assenza

d'ossigeno (e quindi muore al contatto con l'aria). I risultati di queste ricerche sono ancora più difficili da interpretare perché la presenza di germi anormali può testimoniare una superinfezione di una colite infiammatoria preesistente e non il loro ruolo nella comparsa della malattia di Crohn. Numerosi microrganismi sono stati ritenuti responsabili di essere gli agenti eziologici del CD. Tra i recenti batteri candidati, sono da citare il *Cloristridium difficile* e il *Mycobacterium paratuberculosis* (che appartiene allo stesso genere batterico del bacillo della tubercolosi). Questi batteri sembrano potere favorire l'insorgenza della Malattia di Crohn, ma il loro ruolo iniziatore è molto contestato. Il *M. paratuberculosis* è l'agente causale della malattia di Johne, un'enterocolite granulomatosa dei ruminanti, ed è stato isolato nei pazienti affetti da CD. Analogo discorso può essere fatto per alcuni microrganismi del gruppo *Yersinia*, isolati nella biopsie di soggetti con CD (Lamps L.W. *et al*, 2003). La convinzione di alcuni ricercatori che tali microrganismi siano agenti causali della malattia di Crohn non è per altro confortata da criteri epidemiologici, clinici ed immunoistochimici. L'ipotesi prevalente è che questi microrganismi siano dei contaminanti ambientali, capaci di invadere la mucosa intestinale in preda a fenomeni flogistici. La ricerca d'agenti infettivi si orienta attualmente verso un'origine

virale. Una tossina secreta da dei virus potrebbe dunque essere coinvolta. Un'infezione con il virus del morbillo durante i primi giorni di vita, o addirittura durante il primo trimestre della gravidanza, potrebbe giocare un ruolo nell'apparizione 20 o 30 anni dopo della Malattia di Crohn. Un recente studio giapponese ha, però, escluso la presenza di sequenze genomiche del virus in resezioni intestinali e nei linfociti intestinali di pazienti con CD, che pur presentavano un titolo anticorpale contro i determinanti antigenici del virus (Iizuka M., *et al*, 2001). Le ricerche dei virologi sono in piena evoluzione. Sempre nell'ottica di una possibile eziologia infettiva, va ricordata la recente descrizione relativa alla frequente presenza, nei pazienti con CD, di un particolare tipo di anticorpi diretti contro il *Saccaromyces cerevisiae* (ASCA) e gli ANCA. L'osservazione però che questi due tipi di anticorpi si riscontrano anche nei parenti sani dei pazienti, lascia ipotizzare che la loro presenza non sia secondaria all'inflammatione, ma che rappresenti uno dei marker di un disturbo immunoregolato geneticamente determinato (Kim B.G. *et al*, 2002).

Sono stati ricercati possibili fattori immunologici. diversi aspetti del sistema immunitario sono stati studiati e possono portare modifiche nella morfologia e nelle funzionalità nel corso della malattia di Crohn. Linfociti o macrofagi producono delle proteine

specializzate o "mediatori", come il "Tumor Necrosis Factor" (TNF) o certe "interleuchine" (1b, 6 o 8), che possono favorire l'infiammazione, o al contrario opporsi all'infiammazione (interleuchine 2, 4, 10 o 12). Delle altre argomentazioni sono in favore di un cambiamento del sistema di difesa. Alcune manifestazioni extra intestinali, in particolare articolari e cutanee, sono conosciute per essere in rapporto con un problema immunologico. La natura delle lesioni istologiche è anch'essa sintomo di un problema immunologico. Tuttavia, i cambiamenti del sistema immunologico sono, il più delle volte, considerati come secondari alla malattia, non precedenti.

Numerosi meccanismi possono entrare in causa. Un'elevata presenza della sottopopolazione di linfociti Th1, che producono interferony ($INF\gamma$) e interleuchina 2 (IL2), caratterizza la mucosa gastrointestinale e provoca l'attivazione dei macrofagi. Questi ultimi, in risposta alle molecole sopra citate, producono altre citochine, quali l'interleuchina 12 (IL12) e l'interleuchina (IL18), che stimolano i linfociti Th1, amplificando in tal modo il processo infiammatorio. L'attivazione di queste popolazioni cellulari assieme ad altri mediatori infiammatori, specifici e non, tra cui citochine, chemochine, prostaglandine, leucotrieni e metaboliti

dell'ossigeno, portano al caratteristico danno tessutale e favoriscono il processo flogistico (Fig. 2).

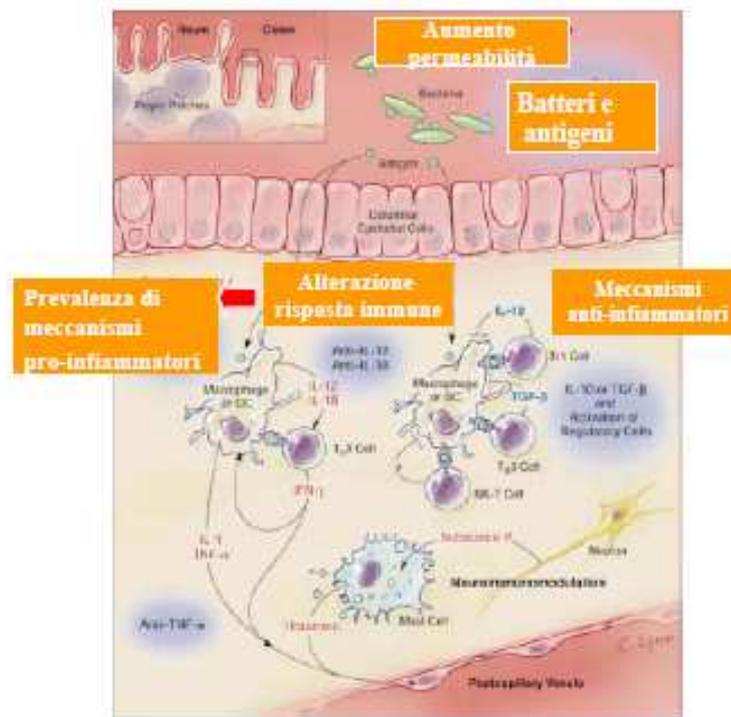


Fig. 2

L'attività pro-infiammatoria dei monociti è controllata prevalentemente dal fattore di trascrizione NF-kB. In seguito ad attivazione, l'NF-kB trasloca dal citoplasma al nucleo dove esercita la sua azione regolando la trascrizione di numerosi geni implicati nella cascata infiammatoria, tra cui quelli responsabili della produzione di citochine quali l'interleuchina 1 (IL1), l'interleuchina 6 (IL6), l'IL12, il tumor necrosis factor alfa (TNF α), di chemochine ed di enzimi (ciclossigenasi, lipossigenasi). Il fattore NF-kB può essere attivato da componenti batterici seguendo diverse modalità. La prima coinvolge l'interazione di recettori di

membrana, appartenenti alla famiglia dei *Toll-like receptor* da parte di lipopolisaccaride batterico (LPS). La seconda dipende dal legame tra componenti batterici dell'LPS (muramil dipeptidi) a una proteina intracellulare chiamata **NOD2** (nucleotide-binding oligomerisation domain 2). Questa proteina intracitoplasmatica è il prodotto del gene IBD1, associato al morbo di Crohn mediante studi di linkage; è stato dimostrato, infatti, che mutazioni a carico di questo gene favoriscono l'insorgenza della patologia. Il gene IBD1 viene espresso principalmente nei monociti, nei macrofagi e nelle cellule dendritiche (Podolowski D.K. *et al*, 2002). Le difese immunitarie inoltre possono essere ridotte dalla denutrizione, dall'essudazione (trasudazione dovuta alle ulcere intestinali, origine di perdita di linfociti e proteine), addirittura da certi trattamenti. Inversamente, l'immunità può essere stimolata anormalmente da un troppo alto afflusso d'antigeni, dai disturbi della permeabilità della parete intestinale (favorita dalle ulcere) lasciando penetrare troppi elementi estranei.

Molti studi hanno permesso di trovare delle linee generali che determinano il contributo della componente genetica nella malattia di Crohn. I punti su cui si basa questa evidenza sono:

- diversa incidenza e prevalenza nelle popolazioni con diverso background etnico;

- eredità familiare: il rischio relativo per un parente di un malato di Crohn di presentare la stessa malattia è 14 volte superiore di un individuo appartenente ad una popolazione di controllo;
- indice di concordanza: nei gemelli omozigoti va dal 42% al 58%, nei gemelli eterozigoti l'indice di concordanza non è significativamente differente da quello degli altri fratelli;
- espressione di specifici markers subclinici che sono tratti familiari: per esempio l'espressione di ASCA (Anti Saccaromyces Cervisiae Antibodies);
- associazione con malattie genetiche somiglianti all'IBD: per esempio la sindrome di Wiskott-Aldrich, la sindrome di Turner e la sindrome di Hermensky-Pudlak;
- associazione con una suscettibilità genetica conosciuta: eczema e psoriasi;
- modelli animali ingegnerizzati che manifestano spontaneamente l'IBD.

Tuttavia un modello genetico semplice non può spiegare la modalità d'ereditarietà di questa malattia. La componente genetica come detto precedentemente è solo uno degli aspetti di questa malattia multifattoriale.

LE POPOLAZIONI CELLULARI NELLA PATOLOGIA

Un ampio e crescente numero di studi sugli animali hanno contribuito a stabilire le basi meccanicistiche per la nostra attuale comprensione della patogenesi delle IBD. Modelli murini con mutazioni indotte o spontanee in una diversità di geni hanno stabilito le complesse interrelazioni che controllano la risposta dell'ospite verso il microbiota intestinale e hanno identificato un certo numero di vie che possono portare alle IBD. Si sono, anche grazie a queste tecniche, identificate le popolazioni cellulari ed i mediatori infiammatori coinvolti nella patologia. Con poche eccezioni, questi modelli implicano un dialogo disregolato tra il microbiota intestinale e dei componenti del sistema immunitario innato e adattivo nello sviluppo della malattia.

Nella malattia Crohn si osserva un'alterazione persistente dei meccanismi di soppressione della risposta flogistica con conseguente cronicizzazione del processo immunoinfiammatorio (infiammazione non controllata). La risposta immunitaria è composta da meccanismi umorali, che comportano la produzione di anticorpi che mediano l'aggressione dell'antigene. Si riscontra, tra l'altro, un'inadeguata e aumentata presentazione degli antigeni luminari alle cellule immunocompetenti della mucosa intestinale

con fenotipo CD4 helper, piuttosto che CD8 suppressor e ciò comporta che i linfociti abbiano un' aumentata produzione di interferone, che sarebbe responsabile dell' infiammazione granulomatosa, con formazione di cellule giganti ed aumentata permeabilità intestinale. In questi processi sono coinvolti la mucosa intestinale, la flora batterica, fattori metabolici, mediatori dell' infiammazione e fattori immunologici. La mucosa intestinale è esposta a un' enorme carico antigenico, rappresentato da batteri (e dalle loro componenti, quali peptidoglicano, lipopolisaccaride, tossine batteriche, superantigeni batterici) e sostanze sfuggite alla digestione; l' intestino si protegge da questi insulti attraverso un meccanismo intraluminare (rappresentato dalla flora batterica endogena, dal muco, dall' integrità della barriera mucosa intestinale) e uno intramucoso (rappresentato dal tessuto linfoide associato alla mucosa intestinale). Se l' antigene riesce a superare questi meccanismi difensivi è in grado di attivare i linfociti T e i macrofagi, che a loro volta producono citochine proinfiammatorie. Ci sono evidenze sperimentali che indicano l' esistenza di un' abrogazione della tolleranza immunologica nei confronti della flora batterica autologa (i linfociti isolati dalla mucosa intestinale di pazienti con CD proliferano in coltura in presenza di antigeni della

flora batterica degli stessi pazienti, mentre questo non avviene in individui sani).

La risposta al microbiota intestinale può essere classificato in tre compartimenti base: l'epitelio intestinale, le cellule del sistema immunitario innato della linea mieloide (ad esempio, monociti, cellule dendritiche e granulociti), e le cellule dell'immunità adattiva (cellule B e cellule T). Anche i Natural killer e le cellule T natural killer possono svolgere anche un ruolo importante, anche se questi sono meno definiti. Modelli con difetti in ciascuno di questi compartimenti sono stati associati con patogenesi di IBD nel topo. In quasi tutti i modelli caratterizzati, una componente primaria della espressione di malattia è una eccessiva reattività dei linfociti T CD4+ verso i batteri enterici. Nella misura in cui la risposta delle cellule TCD4 sono indotte e dirette da parte del sistema immunitario innato, l'interazione tra i microbiota, la barriera intestinale epiteliale, e le cellule dell'immunità innata è criticamente determinante per la risposta delle cellule T CD4 della mucosa. Di conseguenza, la disregolazione in qualsiasi di questi livelli può portare a IBD. Inoltre, una sostanziale porzione delle cellule T della mucosa intestinale comprende cellule T regolatorie che controllano le TCD4 effettrici di risposte. Fino ad oggi, vi sono invece dati limitati che suggeriscono che le risposte delle cellule B

svolgano un ruolo centrale patogenetico. Pertanto illustrativo del complessità dei fattori che contribuiscono alla genetica umana è stato l'uso di mutazioni indotte o spontanee in topi mutanti per mappare geni modificatori nelle IBD.

I MEDIATORI INFIAMMATORI: LE CITOCHINE

Nello sviluppo delle risposte immunitarie sono coinvolti numerosi tipi di molecole, tra cui le citochine, presenti normalmente nel siero. Il termine citochina si riferisce genericamente ad un vasto gruppo di molecole coinvolte nella trasmissione di segnali biochimici intracellulari atti a regolare le risposte immuni locali e sistemiche durante vari processi patologici. Le citochine rappresentano, quindi, un gruppo di molecole proteiche (glicoproteine acide) prodotte da un vasto numero di cellule, principalmente linfociti (spesso definite linfocine), che hanno anche la funzione di indurre e controllare la crescita, la differenziazione, la funzione delle cellule ematiche e lo sviluppo di diverse cellule tissutali. Ciascuna popolazione di cellule rilascia una particolare miscela di citochine, in base al tipo di cellula e al fatto se questa è stata o meno attivata. Per esempio le cellule Th1 rilasciano una serie di citochine che favoriscono le loro interazioni con i fagociti mononucleati, mentre le cellule Th2 secernono una serie differente, che consente loro di attivare le cellule B. Alcune citochine possono venir prodotte da tutte le cellule T, mentre altre solo da una sottopopolazione specifica. Uguale importanza riveste l'espressione dei recettori per le citochine; infatti solo una cellula

che possiede i recettori appropriati è in grado di rispondere ad una particolare citochina. In generale i recettori per le citochine sono specifici per la propria singola citochina.

Le caratteristiche essenziali delle citochine sono: il basso peso molecolare: 15-25 KDa; l'Inducibilità: la loro produzione può venir stimolata da diversi fattori come gli agenti patogeni e le loro tossine (specie LPS), o da un danno tissutale che provoca aggregazione piastrinica, od ancora da stimoli immunologici quali ipersensibilità e da altre citochine (ad esempio l'IL1, una citochina proinfiammatoria); La secrezione, che è in genere un fenomeno di breve durata ed autolimitato: in generale, infatti, le citochine sono prodotte ex-novo dalla trascrizione dei loro geni, e non vengono accumulate nella cellula come molecole preformate; Agiscono legandosi a specifici recettori attivando pathways intracellulari di traduzione del segnale e/o secondi messaggeri: l'affinità di un recettore per la propria citochina è estremamente alta. I recettori delle citochine fanno spesso parte della superfamiglia delle "G-protein-coupled receptor" (recettori associati alle proteine G) che, oltre alle chemochine, legano anche ormoni peptidici e neuropeptidi. Diversi recettori per le citochine inoltre, agiscono come corecettori, in grado di facilitare ad esempio l'entrata del virus HIV in alcune cellule. Il primo corecettore ad essere scoperto

è stato CXCR4, chemokine (C-X-C motif receptor 4), chiamato inizialmente fusina o LESTR32; esso viene espresso in diverse cellule e tessuti, come leucociti del sangue periferico, milza, timo, fegato, reni e placenta. Il suo ligando è stato identificato in SDF-1, uno stromal-derived factor che agisce da chemotattico per i linfociti. Le citochine sono pluripotenti e pleiotropiche: molte citochine sono prodotte da tipi cellulari diversi ed esplicano molte funzioni su tipi cellulari diversi; Alcune citochine possono comportarsi come fattori di proliferazione (ad es. IL2, IL3, IL5) o di differenziamento (IL1, IL4, IL6). Altre sono invece in grado di innescare meccanismi che mediano la morte cellulare o apoptosi. In molti casi è la dose della citochina a decidere il tipo di effetto biologico; Le citochine non sono mai prodotte da sole ma in un insieme di segnali positivi o negativi per una regolazione più articolata (network citochinico); possono agire sinergicamente (l'effetto di due citochine insieme risulta più grande della somma dei singoli effetti) o antagonisticamente (citochine che inibiscono l'azione di altre); Il loro meccanismo d'azione può essere autocrino (agiscono direttamente sulla cellula che le ha prodotte), paracrino (agiscono sulle cellule vicine o a breve distanza) o endocrino (effetti a distanza su cellule lontane, trasportate quindi per via ematica). Le differenti citochine possono venir raggruppate in

famiglie e sottofamiglie in base alla funzione biologica principale o alla loro struttura. Su base funzionale possiamo distinguere: Citochine mediatrici e regolatrici dell'immunità innata: ovvero quelle che sono anche considerate "citochine infiammatorie", prodotte principalmente da fagociti mononucleati per potenziare o inibire le reazioni infiammatorie (TNF- γ , IL1, IL6, IL12, IL15, chemochine, IFN- γ , IFN- γ). Citochine mediatrici e regolatrici dell'immunità specifica: ovvero le "citochine immunitarie", prodotte soprattutto da linfociti T in risposta ad un riconoscimento antigenico specifico, per stimolare e sfruttare al massimo le risposte infiammatorie (IL2, IL4, TGF- γ , IFN- γ , IL5). Citochine stimolatorie della crescita e differenziazione dei leucociti immaturi: ovvero i "Fattori di crescita Emopoietici" (SCF, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, IL3, IL7).

Il TNF- α è una citochina proinfiammatoria ed un importante mediatore dell'immunità naturale. Induce la produzione di altre citochine, l'espressione di molecole di adesione, la stimolazione del linfocita T e B, la soppressione dell'attività della lipoprotein-lipasi. Ha attività su molteplici organi ed apparati ed è causa di cachessia, riassorbimento osseo, febbre, mialgia, inibizione della ematopoiesi. Costituisce una molecola chiave per lo sviluppo e la perpetuazione della flogosi cronica nel CD, avendo proprietà di attrarre le cellule

infiammatorie, attivare la cascata coagulativa ed indurre edema e la formazione di granulomi. Numerosi studi hanno messo in evidenza aumentati livelli di TNF- α nella mucosa intestinale di pazienti adulti e pediatrici con CD. I trattamenti **anti-TNF- α** possono avvenire a vari livelli come l'inibizione della trascrizione, inibizione della sintesi, inibizione della processazione e della attivazione. Si può interferire con la trascrizione della molecola con inibitori della fosfodiesterasi, con oligonucleotidi anti-senso, con la talidomide, che accelera la degradazione dell'RNA messaggero, che codifica la proteina. (Van Dullemen H.M. *et al*, 1995). La rapida evoluzione della ricerca, particolarmente in ambito immunologico, ha portato recentemente alla realizzazione di un nuovo anticorpi neutralizzante direttamente il TNF- α , **l'infliximab**. Si tratta di un anticorpo monoclonale, chimerico, antifattore di necrosi tumorale- α , che negli ultimi anni sta riscuotendo numerosi consensi, quale approccio terapeutico alternativo per il CD, ad esordio non solo in età adulta, ma anche pediatrica (Hyaams J.S. *et al.*, 2000). Le principali indicazioni all'utilizzo dell'infliximab sono rappresentate dal CD refrattario al trattamento con steroidi e/o immunosoppressori e del CD in forma fistolizzante. Gli effetti positivi e il profilo di tollerabilità relativamente buono hanno condotto quindi ad un suo uso sempre più diffuso nella pratica

clinica. I risultati di trials clinici più recenti indicano inoltre che il farmaco può essere efficace e privo di rischi significativi anche quando utilizzato per una terapia di mantenimento. In termini di effetti collaterali il farmaco si è dimostrato piuttosto sicuro. Come con qualsiasi infusione di anticorpo monoclonale anche quelle di infliximab possono dare luogo a reazioni di infusione e possono attenuare la risposta del farmaco stesso. Una varietà di complicanze infettive sono state descritte. Recenti studi riguardano la **terapia anti-interleuchina 12**. La proteina dimerica di fusione IL12 (P40) IgG2b. Essa lega in maniera specifica il recettore della IL12, che aumenta di espressione nelle cellule della mucosa intestinale nel CD in attività. L'IL12 viene principalmente prodotta dalle cellule presentanti l'antigene e secreta nella mucosa intestinale e agisce attivando la risposta infiammatoria dei linfociti Th1 nei pazienti con CD. Tuttavia si è visto che la flogosi della mucosa può venir arrestata da anticorpi di sintesi, che riescono ad antagonizzare l'azione dell'IL12, bloccandone il recettore. Stallmach *et al.* (2004) hanno generato una proteina chimerica, consistente di due subunità P40 della citochina, fuse alla regione costante IgG2b, che, a bassa concentrazione, inibisce la reazione infiammatoria delle cellule mononucleate (LPMNC) a livello della lamina propria della mucosa intestinale, sia *in vivo* che *in vitro*.

ASPETTI GENETICI NELLA MALATTIA DI CROHN

L'obiettivo primario di studi genetici in IBD è la identificazione delle priorità e dei meccanismi che contribuiscono all'espressione clinica della malattia. L'identificazione dei principali meccanismi patogeni servirà a dare sviluppare approcci terapeutici nelle IBD. Una moltitudine di modelli murini di genetica delle IBD mostra l'ampia varietà di meccanismi molto diversi che può indurre come possibile risultato un IBD-fenotipo. Il complesso e delicato equilibrio necessario per mantenere l'omeostasi intestinale può essere interrotto da un aumento o una diminuzione espressione di una sempre crescente catalogo di geni. Un secondo obiettivo degli studi di genetica nelle IBD è la sviluppo di modelli predittivi di rischio, sia nei parenti sani dei pazienti con IBD sia in pazienti con diagnosi di IBD in previsione delle sviluppo della malattie . Mentre numerosi studi genetici di IBD hanno sperimentato tramite la statistica e stabilito le interazioni tra i geni di suscettibilità. Sebbene l'eziologia precisa delle IBD non sia ancora ben conosciuta, analisi genetiche di aggregazione familiare e studi di concordanza su gemelli monozigoti, hanno mostrato che i determinanti genetici hanno un ruolo sia nella penetranza della malattia che nella sua eterogenicità.

Le indagini epidemiologiche e gli studi genetici di segregazione condotti negli ultimi anni, hanno evidenziato che un modello Mendeliano semplice di trasmissione ereditaria (correlazione diretta tra gene e malattia) non è applicabile alle IBD: queste malattie sono infatti poligeniche e multifattoriali. In questi disordini il fenotipo clinico è la manifestazione dell'interazione tra determinanti genetici e fattori di rischio ambientali, pertanto ogni variante genetica individuale avrà un effetto relativo (mai 100%) sul rischio di sviluppo della malattia. Nell'ultimo decennio, attraverso studi di linkage e di associazione familiare sono stati individuati diversi loci responsabili di suscettibilità alle IBD.

I geni implicati nella predisposizione della malattia di Crohn sono stati identificati utilizzando particolari marcatori genomici (microsatelliti) all'interno di famiglie con due o più soggetti affetti.

L'analisi di un numeroso gruppo di soggetti ha permesso di identificare regioni genomiche contenenti i geni candidati.

Utilizzando questo metodo sui pazienti con malattia di Crohn, Hugot e colleghi nel 2001 hanno individuato un locus di suscettibilità, che si trova nella regione pericentromerica nel cromosoma 16, noto come IBD1.

Successive analisi, con metodi di *positional cloning* e *linkage disequilibrium*, infine, hanno permesso di identificare in questa

regione una stretta correlazione tra questa regione ed un singolo gene: il NOD2 anche noto come CARD15 (caspase-recruitment domain protein 15). Questo gene codifica per una molecola intracellulare appartenente alla famiglia NOD che si pensa essere coinvolta nel riconoscimento dei batteri. Il gene CARD15/NOD2 è oggi considerato il più importante gene coinvolto nella CD. Tra le varianti geniche individuate sul gene NOD2, tre sono associate alla suscettibilità alla CD e sono presenti in circa il 40% dei pazienti. Il gene NOD2 è composto da 11 esoni costanti e da un dodicesimo alternativo nella regione 5. NOD2 Codifica per una proteina di 1040 aminoacidi che contiene diversi domini funzionali. In un recente studio (Lesage S. *et al*, 2002) sono state evidenziate più di 30 mutazioni a carico di tutto il gene NOD2. Di queste 30 varianti genetiche, tre sono state confermate essere associate indipendentemente con la suscettibilità al CD e rappresentano l'82% delle mutazioni cromosomiche. Queste tre varianti alleliche sono:

- R702W (C2104T), posizionata sull'esone 4;
- G908R (G2722C), posizionata sull'esone 8;
- 1007fs (3020insC), sull'esone 11.

Le prime due mutazioni sono definibili come mutazioni missense, non conservative: sono identificate anche loro come mutazioni

causanti malattia (Disease Causing Mutation), ma non producono alterazioni della struttura come la 3020insC. Inoltre altre 27 rare mutazioni minori, sono state considerate come mutazioni che potrebbero causare malattie (DCMs). La proteina NOD2 viene espressa principalmente nella cellule della linea monocitica, macrofagica e dendritica e anche dalle cellule epiteliali. Le sue funzioni principali consistono nel promuovere l'attivazione di NF- κ B; partecipare nell'attivazione della cascata delle caspasi nel fenomeno apoptotico. Il modello del meccanismo d'azione della proteina (Fig. 6) prevede che interagisca con i prodotti batterici (LPS) e promuova la migrazione del fattore NF- κ B nel nucleo, dove viene attivata la trascrizione di geni che codificano per citochine proinfiammatorie (es. TNF- α) (Girardin S. *et al*, 2003 b). Attualmente i test genetici che si attuano di routine nella pratica ospedaliera, coinvolgono solo le tre varianti alleliche sono, R702W, G908R, 3020insC. Recemente, la Genome-wide association (GWA), una nuova tecnica per lo studio del genoma umano si è affermata, fornendo nuovi elementi di primaria importanza nella comprensione dei meccanismi patogenetici delle IBD.

Con la GWA molti nuovi geni, come il gene per il recettore dell'interleuchina-23 (IL23R), gene fortemente coinvolto nella CD, ed altri geni sono stati individuati in associazione alla CD.

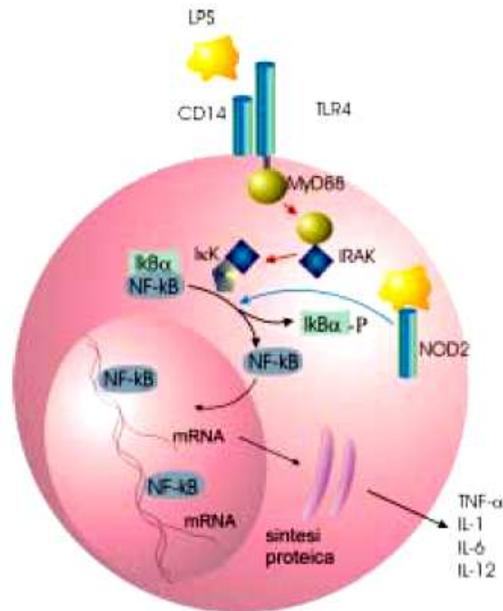


Fig. 3: Cascata di eventi indotta dall'interazione dell'LPS batterico con il TLR4 e il possibile comportamento di NOD2 come recettore intracellulare.

Tra le varie associazione gene-malattia, l'associazione al gene ATG16L1, coinvolto nei processi di auto-fagocitosi, risulta molto forte. Nel complesso, questi studi promettono di cambiare la nostra comprensione della fisiopatologia della IBD e di avere implicazioni per la pratica clinica. In futuro, poichè il numero e la potenza degli studi di GWA avanza, è probabile che un numero crescente di correlazioni per le IBD umane saranno individuate per questi e altri geni

IL NOD2 (Nucleotide Oligomerization Domain 2)

Il gene CARD15/NOD2, è stato identificato nel 2001 da Hugot nel cromosoma 16, nella regione pericentromerica 16q, ed è il più importante dei geni coinvolti nella suscettibilità alla CD.

NOD2 codifica per una proteina espressa nei monociti, nei macrofagi, nelle cellule dendritiche, nelle cellule epiteliali dell'intestino e 'in particolare nelle cellule di Paneth della parte terminale dell'ileo.

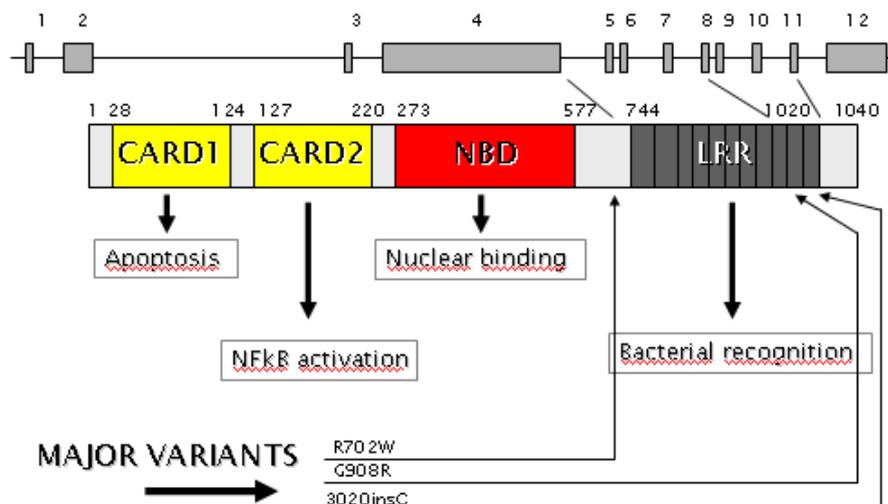


Fig.4: Struttura della proteina NOD2, domini funzionali e localizzazione delle mutazioni correlate con la malattia di Crohn

La proteina è costituita da 2 domini CARD N-terminali, un dominio centrale di oligomerizzazione (NOD) e una regione C-terminale con ripetizioni di leucine (LRR). I domini CARD (Caspase Activation Recruitment Domain) sono responsabili del legame con altre proteine con domini simili.

Il dominio NOD (Nucleotide Oligomerization Domain) media l'oligomerizzazione delle proteine contenenti i domini CARD, permettendo l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B.

Il dominio LRR (Leucine-Rich-Repeat), come gli LRR dei recettori toll-like, media la risposta al muramil-dipeptide (MDP). La proteina NOD2 ha funzione di sensore intracellulare nella risposta immunitaria innata contro batteri gram-negativi e gram-positivi.

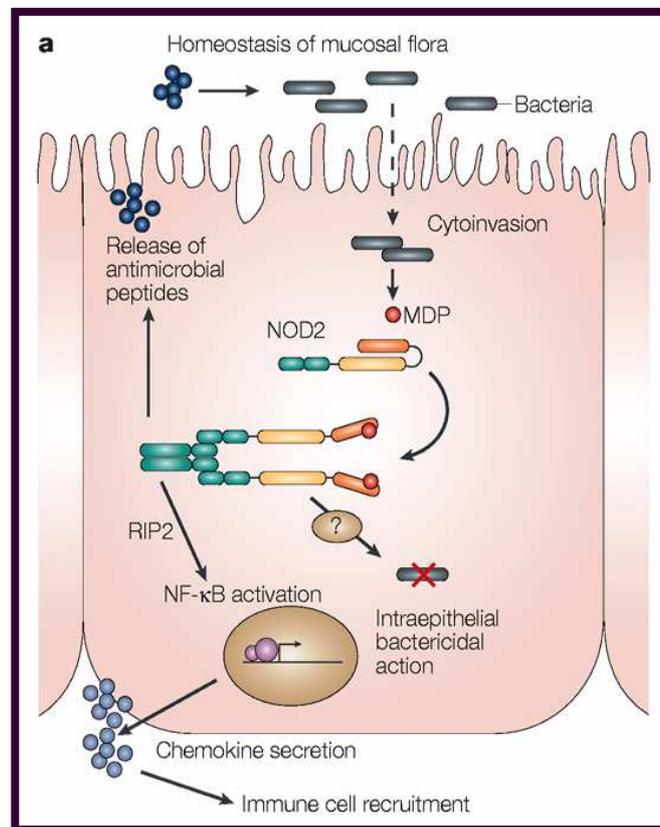


Fig.5: Ruolo della proteina NOD2 nella risposta ai patogeni: attivazione della risposta immunitaria e secrezione di peptidi antimicrobici. Schreiber S, Nat Rev 2005

NOD2 in particolare è coinvolta nel riconoscimento intracellulare del muramil dipeptide (MDP) derivato dal peptidoglicano batterico. Si pensa che il MDP entri all' interno della cellula mediante un

meccanismo sconosciuto e poi leghe e attivi NOD2. Questa proteina ha un duplice ruolo nella risposta ai patogeni: essa infatti permette l'attivazione del fattore di trascrizione. NF- κ B che, tramite la secrezione di chemochine, attiva la risposta immunitaria, e, contemporaneamente, stimola la secrezione di peptidi antimicrobici, tra cui le α -defensine.

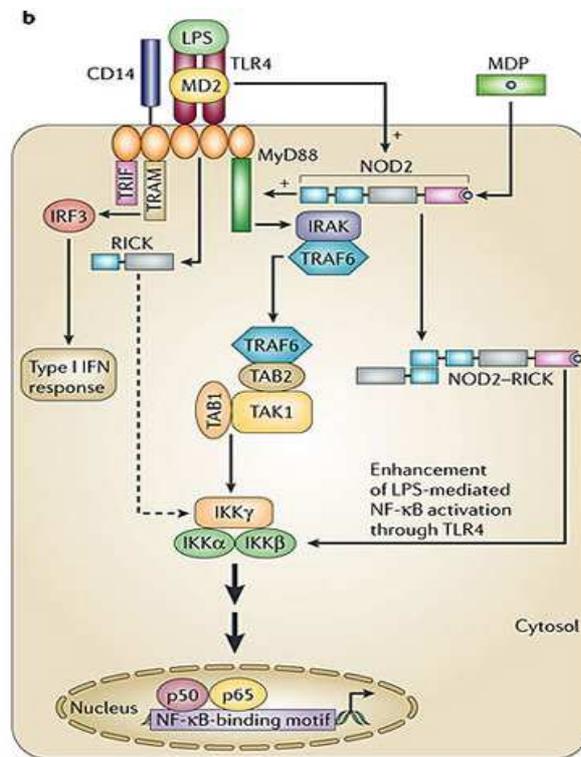


Fig.6: Attivazione di NF- κ B da parte della proteina NOD2: via RICK-dipendente e via RICK-indipendente. Strober W *et al.* Nat Rev Immunol (2006)

Il legame con il MDP attiva NOD2 e ne determina un cambiamento conformazionale che permette l'associazione con RICK/RIP2, questo complesso attiva una cascata di reazioni che ha come effetti l'attivazione di NF- κ B e la secrezione di peptidi antimicrobici come

le α -defensine. Contemporaneamente, NOD2 attivato interagisce con MyD88 e attiva NF- κ B con un meccanismo RIK-indipendente. All'interno del gene NOD2 sono state ritrovate circa 30 varianti; di queste solo 3 al momento risultano associate alla CD e sono presenti nel 40% dei pazienti: due mutazioni missense R702W e G908R e una mutazione frameshift Leu1007fiC. Queste tre mutazioni sono localizzate in una zona interna o adiacente al dominio LRR, tutte causano una alterazione della funzionalità della proteina con una conseguente diminuzione dell'attivazione di NF- κ B e della secrezione delle α -defensine.

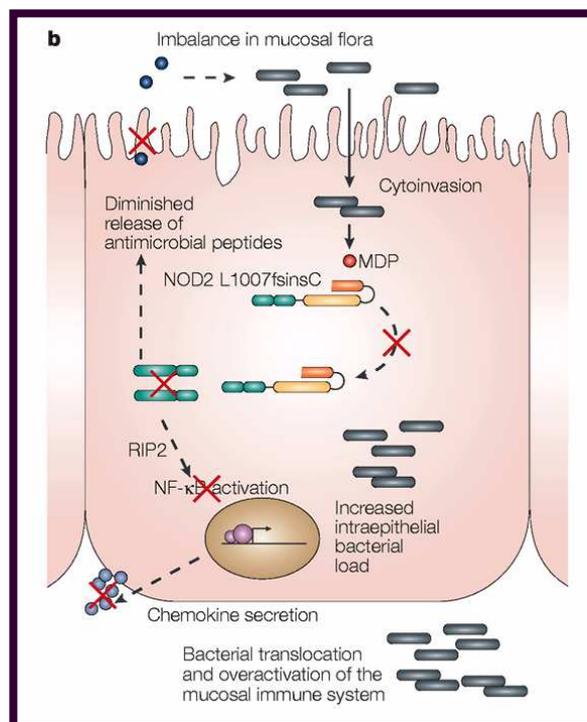


Fig.7: Effetti della mutazione Leu1007fiC sulla funzione di protezione contro i batteri patogeni della proteina NOD2. Schreiber S, Nat Rev 2005
La mutazione Leu1007fiC (3020InsC) causa la formazione di una proteina trunca mancante di 33 aminoacidi distali del dominio

LRR, questo porta ad una perdita dell'attività funzionale della proteina

Le altre mutazioni sono: la 2104 T~C che causa sostituzione dell'arginina 702 con un residuo di triptofano (R702W) e la 2722 G~C che porta alla sostituzione di una glicina con un'arginina in posizione 908 (G908R). Queste varianti alterano la conformazione proteica e quindi interferiscono con il legame con il MDP.

Una via alternativa di attivazione di NF-kB è quella mediata dal recettore Toll like 2 TLR2;

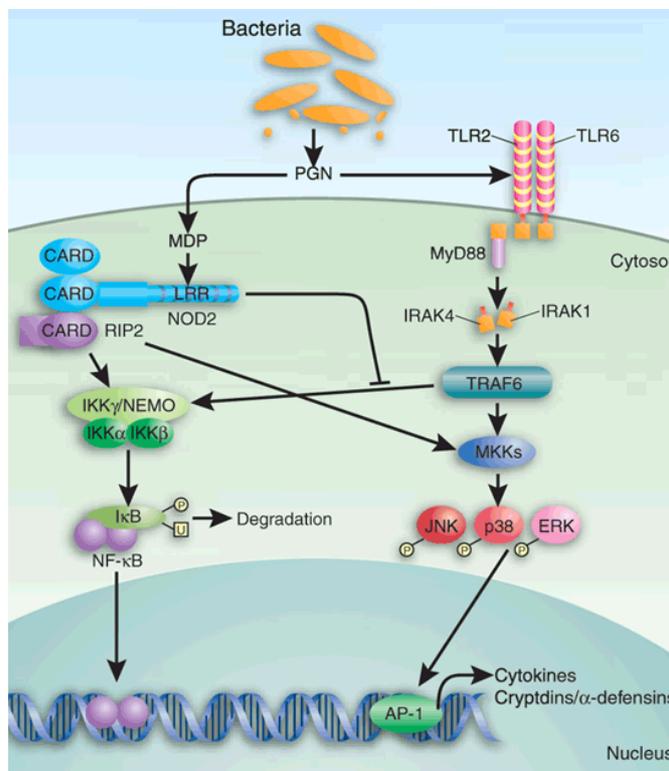


Fig. 8: Via di attivazione di NF-kB mediata da TLR2 (NOD2-indipendente). NOD2 inibisce questa pathway. Kelsall B, Net Med 2005

questo meccanismo è normalmente inibito dal NOD2. Quando invece NOD2 presenta delle mutazioni, e non è quindi funzionale, l'attivazione NOD2-indipendente di NF-kB non viene più inibita.

Una potenziale spiegazione dell'associazione delle mutazioni del NOD2 con il CD è che queste varianti provocano una risposta difettosa delle vie di protezione verso i prodotti batterici, come il MDP. Ciò potrebbe comportare una attivazione secondaria e diffusa di NF-kB mediante il meccanismo NOD2-indipendente.

IL RUOLO DELL'IL23 NELLA PATOGENESI DELLE IB D

L'Interleuchina-23 (IL-23) è una citochina eterodimerica che consiste di due subunità, una chiamata p40 (cromosoma 5q33), che è condivisa con un'altra di citochina, IL-12, e un'altra chiamata p19 (cromosoma 12q13) subunità alfa della IL-23. L'IL-23 svolge una parte importante della risposta infiammatoria contro le infezioni. IL-23 è una citochina fondamentale nella differenziazione delle cellule T-helper, in particolare per la loro differenziazione in cellule Th17 (Fig. 9).

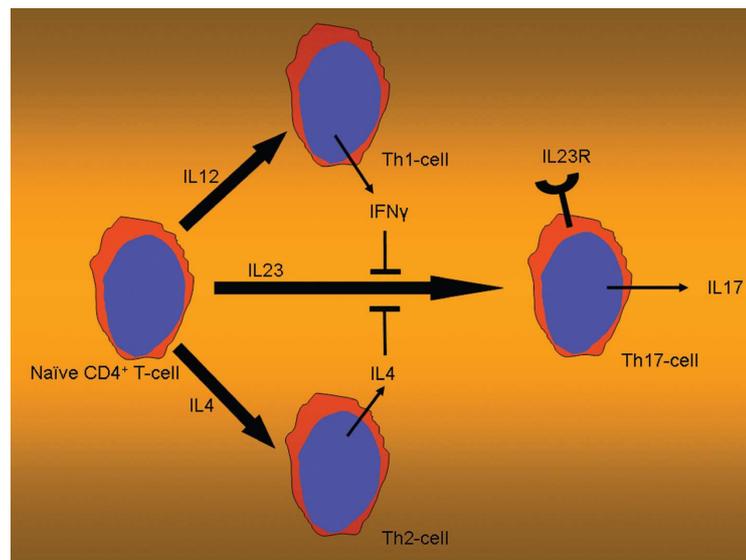


Fig. 9: IL23R (recettore per l'interleuchina-23): Il ruolo centrale nella differenziazione delle cellule T-helper.

IL12=interleuchina12;IL4=interleuchina4;IFN γ =interferone- γ ;

IL17=interleuchina17; Th1cell=cellula T-helper1; Th2-cell=cellula T-helper2

l'IL-23 In collaborazione con IL-6 e TGF- β 1, IL-23 stimola le cellule T CD4⁺ native a differenziarsi in un nuovo sottoinsieme di cellule chiamate cellule Th17, che si distinguono dalle classiche

cellule Th1 e Th2. Le cellule Th17 producono l'IL-17, una citochina che migliora e stimola la produzione di molecole proinfiammatorie come IL-1, IL-6, TNF-alfa, IL-2, e la conseguente infiammazione da chemochine ed il differenziamento cellulare proinfiammatorio. Modelli animali che utilizzano topi Knockout, deficienti in entrambi, p40 e/o p19, le subunità di questa citochina, o in entrambe le subunità del recettore per l'IL-23 (IL-23r e IL12R- β 1) sviluppano sintomi meno gravi, ad esempio, per la sclerosi multipla o per la malattia infiammatoria intestinale evidenziando l'importanza di IL-23 nel percorso proinfiammatorio. La popolazione di cellule T definite Th17, in quanto caratterizzate dalla produzione di IL-17, è stata individuata recentemente. IL-23 promuove la differenziazione delle cellule TCD4⁺ (inesperte) verso le Th17, mentre l'IL-12 gioca il ruolo chiave nella differenziazione verso le Th1. La condivisione di subunità da parte di queste citochine, IL-23 ed IL12 e dei loro recettori, può essere a monte della confusione creata in passato nell'assegnare il ruolo svolto dall'IL-12 e dalle cellule Th1 in certe condizioni patologiche. Alla luce delle nuove acquisizioni si è giunti a un'ampia rivalutazione del ruolo dell'IL-12 e delle cellule Th1 nelle malattie infiammatorie. Questa nuova ondata di studi ha avuto infatti come risultato il riconoscimento del ruolo dell'IL-23 e delle cellule Th 17

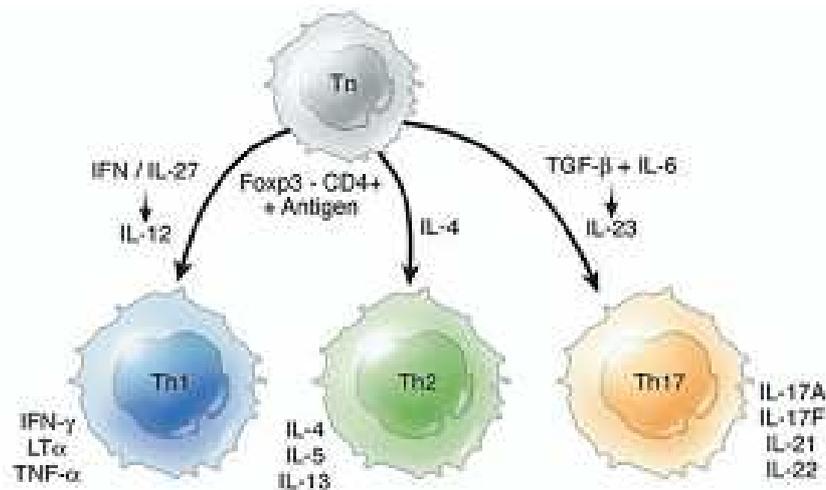


Fig.10: sviluppo delle cellule TCD4 effettrici. Questo schema mette in evidenza il ruolo chiave delle citochine induttive e effettrici associate con lo sviluppo e la funzione delle linee Th1, Th2, e Th17 nei topi. TN=Cellule T CD4 naive.

in patologie quali l'artrite e gli stati infiammatori delle mucose digestive. Esistono anche ricerche che ipotizzano un loro ruolo nel diabete Tipo 1. Gli studi più recenti hanno mostrato gli effetti sulla risposta infiammatoria a seguito del blocco della subunità p40 con anticorpi o con mutazioni mirate. I risultati di questi studi, dapprima interpretati come una dimostrazione del coinvolgimento dell'IL-12 e, di conseguenza, delle cellule Th1 nella patogenesi dei momenti infiammatori hanno accertato invece, anche grazie a studi successivi effettuati con il blocco mirato dell'IL-23, che il risultato ottenuto è l'alleviazione di parecchie delle situazioni infiammatorie suddette. Gli studi di associazione genetica umana con la via dell'IL-23 coincidono con i significativi progressi nella comprensione del suo ruolo di mediazione nell'infiammazione

cronica. IL-23 è stata associata quindi ad una nuova stirpe di cellule TCD4, la Th17, che a sua volta è stata legata alla patogenesi della malattia di Crohn.

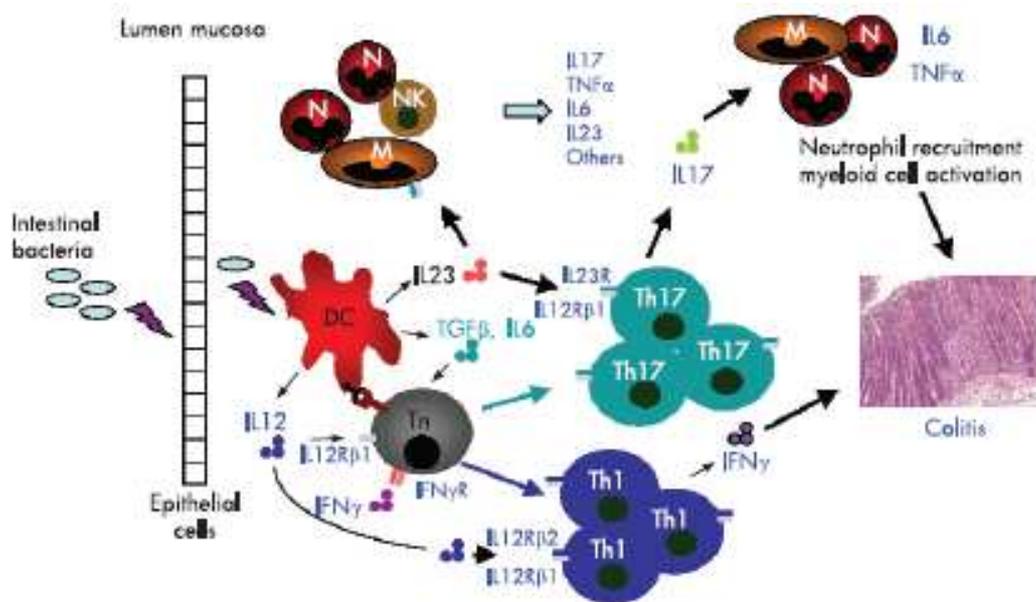


Fig.11: DC=cellule dendritiche; M=macrofagi; IFN γ =Interferone- γ ; Tn=CelluleTCD4⁺; Th1=T helper di tipo 1; TGF β =fattore di crescita trasformante β ; IL23R=recettoreIL23; N=neutrofilici

Le cellule Th17 si distinguono dalle classiche cellule Th1 e Th2, sia per le citochine che inducono la loro differenziazione sia per la loro produzione di citochine (Figura 2). IL23 orchestra l'infiammazione intestinale attraverso molteplici percorsi (Figura 5). La stimolazione batterica intestinale induce la produzione di citochine da parte delle cellule epiteliali della mucosa intestinale, cellule dendritiche (DC) e macrofagi (M). L'Interferone γ (IFN γ) e IL12 agiscono sulle Cellule TCD4⁺ (Tn) stimulate dagli antigeni per indurre la differenziazione dei linfociti T helper di tipo 1 (Th1) IFN γ -secernente, mentre il fattore TGF β e IL6 promuovono lo

sviluppo delle cellule Th17 che producono IL17 ed esprimono recettore per IL23 (IL23R). IL23 viene prodotto dalle DC attivate sostiene la risposta delle Th17 ed attiva anche cellule di immunità innata comprese cellule mieloidi (M) e cellule NK (NK) per produrre citochine infiammatorie compresi IL6, tumor necrosis factor α (TNF α) e IL17 che guidano l'infiammazione intestinale. IL17 agisce attivando macrofagi e ne stimola la produzione di citochine e può indurre le cellule endoteliale alla produzione di citochine e chemokine, guidando così il reclutamento dei neutrofili (N). Di conseguenza, IL-23 agisce da potente amplificatore della cascata infiammatoria, nella risposta immunitaria adattiva, guidata dal Th17, a vari livelli. La produzione di IL-23 sembra limitata alle cellule del sistema dell'immunità innata, in particolare cellule dendritiche e macrofagi. La subunità specifica di IL-23, p19, è indotta dalla stimolazione di recettori specifici, in particolare TLRs e dectin receptors, che sono attivati da strutture conservate di batteri o funghi. Pertanto componenti, batteriche o fungine del microbiota intestinale, dovrebbero attivare la produzione di IL-23 da parte cellule immunitarie innate. In breve per mantenere alta la guardia nei confronti dell'enorme carica microbica presente nel lume intestinale, una stimolazione continua della barriera epiteliali stimola continuamente la produzione di bassi livelli, ma costanti, di

IL-23 da parte cellule dendritiche per mantenere un equilibrio con la flora intestinale in uno stato di quiete.

IL RECETTORE DELL'IL23 (IL23R)

L'interleuchina 23 è una proteina che regola l'infiammazione cronica ed interviene in caso di infezioni batteriche. IL23 media l'infiammazione intestinale attraverso il suo recettore funzionale IL23R che è un eterodimero costituito da una subunità IL12R β 1 (cromosoma 19p13), che è condiviso con il recettore per IL12 (IL12R) e una subunità specifica per IL23, IL23r (cromosoma 1p31), che è espressa da cellule T attivate e cellule mieloidi. L'induzione del componente specifico di IL-23r è limitata a sviluppare cellule Th17 a valle di segnalazione di IL-6 tramite STAT3 (Figura 7). Le interazioni tra IL-23 con il suo recettore sembrano svolgere un ruolo centrale nella patogenesi delle IBD. Sebbene le risposte anomale da parte dei Th1 al microbiota sono state tradizionalmente associate con le IBD, il ruolo della via dell'IL-23 nella malattia infiammatoria cronica negli esseri umani, tra cui le IBD, che è stata prefigurata da studi immunologici in modelli murini, viene ad essere sempre più accreditata. Questa recente revisione, delinea una particolare attenzione per la genetica ed in particolare l'associazione dei polimorfismi del recettore di IL23 (IL23R) e dell'IL-23 con le IBD. La mutazione individuata recentemente per il gene IL23r conferisce protezione verso la CD

ed è stato identificato da un consorzio di ricercatori Nord-americani (the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases of the National Institutes of Health). I ricercatori hanno dimostrato che una variazione nel gene del Recettore dell'interleuchina 23 (IL23R), la Arg381Gln, è presente nella popolazione sana, ma è molto rara nei soggetti affetti da CD.

La recente messa a fuoco dei Th17 in modelli di topo è stata rafforzata dagli studi genetici GWA trovando un collegamento tra IL-23r umano e CD. IL-23r ha un ruolo nel partecipare alla differenziazione e amplificazione dei Th17 e nelle loro risposte, sia attraverso percorsi antigene-dipendente che indipendente. IL-23r è anche espresso da cellule dendritiche mature e cellule natural killer, in cui la sua funzione è meno chiaramente definito, ma potrebbe essere importante anche nella patogenesi della malattia.

Di conseguenza, IL-23r è presente nei linfociti e nei macrofagi, dove svolge un ruolo importante nell'attivazione e nel mantenimento dell'infiammazione.

L' IL23 è già stata associata nella patogenesi delle IBD e della psoriasi, ma questa nuova variazione identificata nel gene del recettore (che determina il cambio di un aminoacido nella posizione 381 della proteina da Arginina a Glutammina) potrebbe svelare una

nuova strada sia per svelare la patogenesi della malattia, sia per un potenziale trattamento farmacologico.

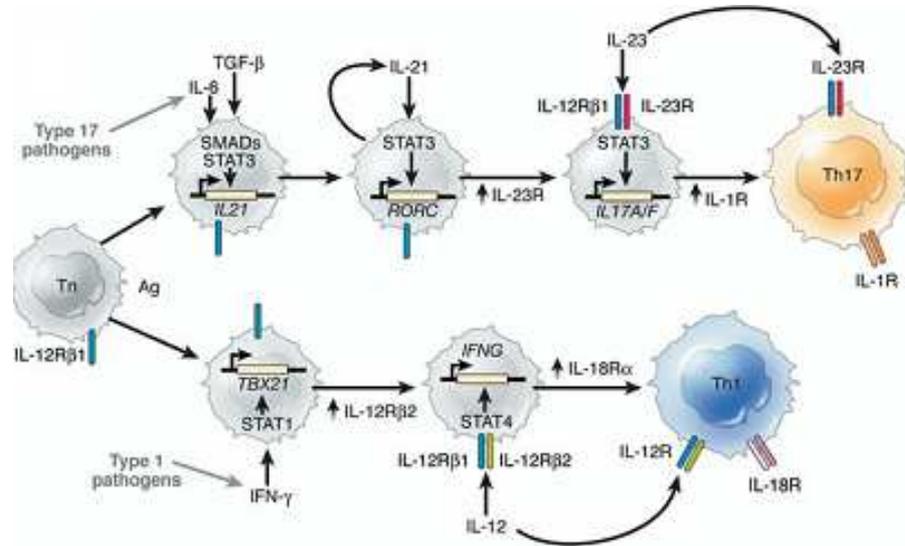


Fig. 12: lo sviluppo della divergenza Th1 e Th17.

Questo schema evidenzia citochine chiave, componenti di segnalazione, e fattori di trascrizione che distinguono Th1 e Th17 sviluppo. TN,=cellule T CD4 native

I ricercatori Nord Americani, con una tecnologia d'avanguardia, hanno esaminato circa 300.000 variazioni del codice genetico (denominati polimorfismi di singoli nucleotidi; SNPs nell'abbreviazione anglosassone), nei circa 22.000 geni presenti nell'intero genoma umano, utilizzando la piattaforma Illumina HumanHap 300 Genotyping Bead Chip, con lo scopo di identificare variazioni che possano spiegare la predisposizione genetica nelle IBD. Lo studio preliminare è stato realizzato in 547 pazienti con malattia di Crohn e 548 controlli sani della popolazione. Successive analisi statistiche, hanno focalizzato l'attenzione dei ricercatori su una variazione aminoacidica (Arg381Gln) nel gene del recettore

dell'interleuchina 23 (IL23R) localizzato nel cromosoma 1 nella posizione p31. Studi di replicazione hanno confermato l'associazione del gene IL23R con la malattia di Crohn. In particolare, nei pazienti affetti da IBD, l'allele che presenta la Glutamina nella posizione 381 è meno comune (1.9%) rispetto ai controlli sani della popolazione (7.0%). Inoltre, l'allele che presenta la Glutamina, è raramente trasmesso dai genitori portatori dell'allele ai figli affetti. Nello studio sono state identificate altre variazioni all'interno del gene IL23R associate alle IBD; alcune sono ereditate contemporaneamente alla Arg381Gln, ma altre sono ereditate in maniera indipendente, indicando che nel gene ci sono diverse varianti che conferiscono il rischio di malattia che devono essere ulteriormente valutate.

I ricercatori hanno concluso che la mutazione Arg381Gln nel gene IL23R può conferire una protezione di circa il 75% nei riguardi delle IBD. Inoltre questo recettore è ovviamente implicato nella regolazione dell'attività dell'IL23, la quale a sua volta promuove una forte attivazione delle cellule T e la perpetuazione della risposta infiammatoria organo-specifica (inclusi gli organi del tratto gastrointestinale). Pertanto, questo recettore e la stessa IL23 rappresentano un potenziale bersaglio per future terapie farmacologiche nelle IBD, tramite anticorpi monoclonali, proteine

di sintesi e antagonisti recettoriali. Tuttavia l'attività dell'IL23 in risposta alle infezioni da micobatteri ed altre infezioni intestinali potrebbe essere essenziale; infatti un modello sperimentale di colite murina è aggravato in assenza dell'IL23.

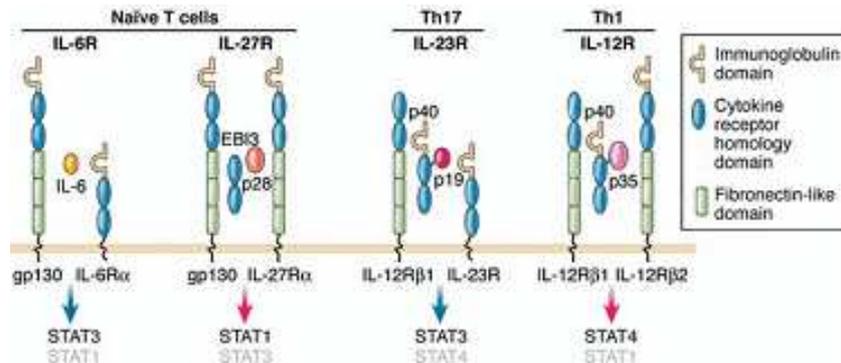


Fig. 13: Vengono mostrati i principali recettori e ligandi espressi da cellule T immature, Th17, Th1. omologia Strutturale tra l'IL-6, IL-12, IL-23, e IL-27 recettori è evidente, compresi i componenti condivisi di IL-6 e IL-27 recettori, gp130. L'IL-6 e IL-27 recettori sono espressi dalle cellule T immature, come la subunità IL-12Rβ1 che è comune a IL-12 e IL-23 recettori. La subunità inducibile del recettore IL-23, IL-23r, si esprime a valle sulle Th17.

Uno studio pilota pubblicato sul New England J. of Medicine nel 2004 utilizzando un anticorpo che blocca sia l'IL23 che l'IL12 ha riportato risultati promettenti. Per concludere, fattori che di norma down-regolano l'induzione e la funzione del percorso Th17 potrebbero anche svolgere un ruolo importante e sono ancora da definire (Figura 9).

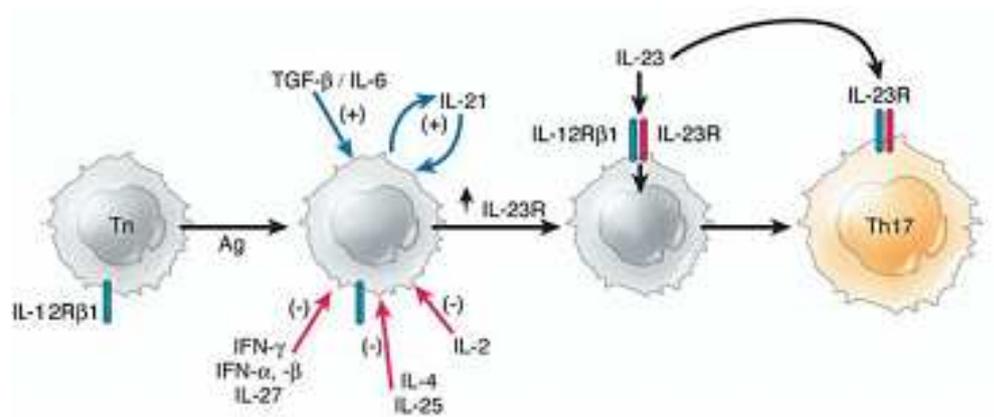


Fig. 14: fattori positivi e negativi di sviluppo e di regolamentazione Th17. Questo schema evidenzia il ruolo chiave di citochine che promuovono o inibiscono lo sviluppo di Th17

Così, l'interferone gamma e IL-27, che possono bloccare lo sviluppo di Th17 attraverso STAT1. Ci sono più geni e percorsi associati con lo sviluppo e la funzione delle cellule Th17 che sono suscettibili di essere chiariti come "importanti" obiettivi di analisi.

IL PROCESSO AUTOFAGICO E L'ATG16L1 NELLA MALATTIA

L'autofagia è una via di degradazione lisosomiale che è essenziale per la sopravvivenza, la differenziazione, lo sviluppo, e l'omeostasi cellulare. L'autofagia ha principalmente un ruolo adattativo per proteggere gli organismi contro diverse patologie, comprese le infezioni, il cancro, la neurodegenerazione, l'invecchiamento, e le malattie cardiache. Tuttavia, in determinate impostazioni di malattia indotta sperimentalmente, si evidenzia che alterazioni della via autofagica possono essere deleterie.

L'autofagia (dal greco, "auto" se stessi ", phagy" da mangiare) si riferisce a qualsiasi via cellulare degradativa che coinvolge la consegna di materiale citoplasmatico al lisosoma. Almeno tre forme sono state identificate: autofagia mediata da chaperonine, microautofagia, e macroautofagia che si differenziano per le loro funzioni fisiologiche e le modalità di consegna al lisosoma dei prodotti da digerire. In questa sede si descrive la macroautofagia (di seguito denominato come autofagia), il principale meccanismo catabolico che le cellule eucariotiche usano per degradare proteine ed organelli cellulari. Questa forma di autofagia comporta la consegna di materiale citoplasmatico sequestrato all'interno di vescicole a doppia membrana al lisosoma (Figura 1). L'autofagia

tramite la degradazione lisosomiale, è un percorso che è essenziale per la sopravvivenza, la differenziazione, lo sviluppo, e l'omeostasi cellulare. L'autofagia svolge un ruolo importante nella protezione degli organismi nei confronti di diverse patologie, tra cui le infezioni, il cancro, la neurodegenerazione, l'invecchiamento e la malattia cardiaca. Tuttavia, si evince da alcuni modelli sperimentali che paradossalmente le funzioni di autofagiche possono essere deleterie.

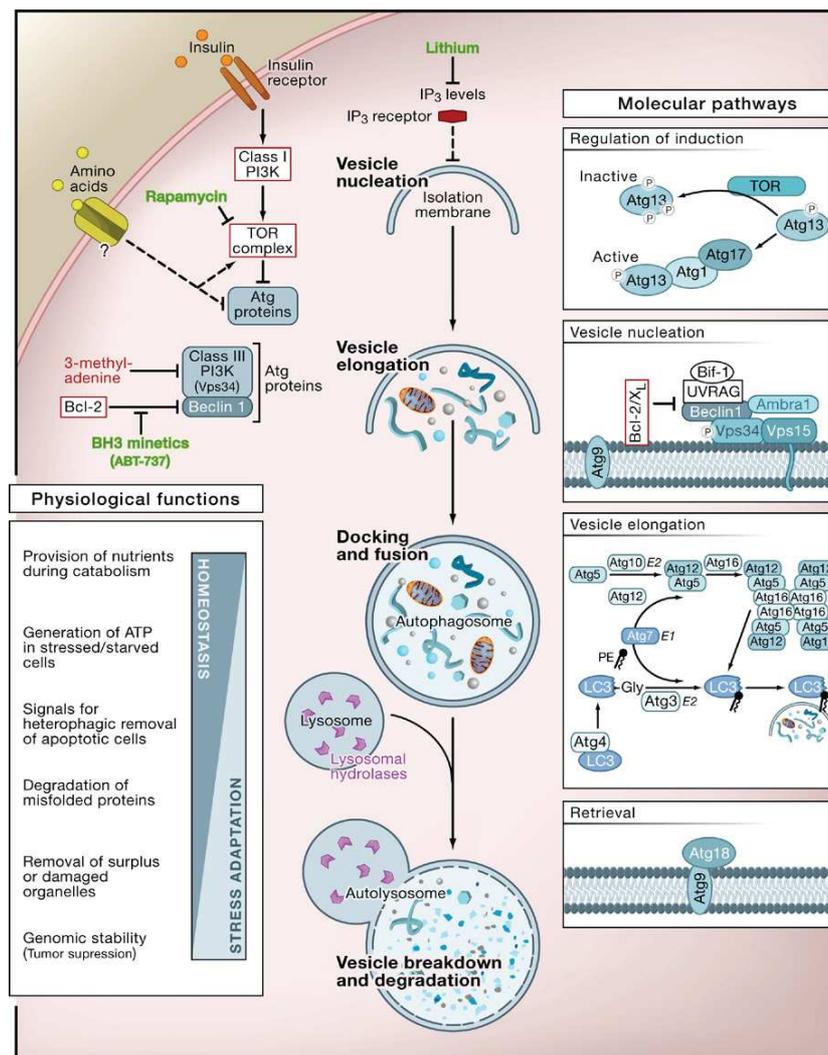


Figura 15. Aspetti cellulari, molecolari, e fisiologici della Autofagia

I primi stadi del processo autofagico includono la formazione (nucleazione della vescicola) e l'espansione (allungamento della vescicola) di una membrana di isolamento chiamato fagoforo. Successivamente la fusione delle estremità del fagoforo per formare l'autofagosoma comporta la formazione di un organello provvisto di membrana a doppio strato, che sequestra il materiale citoplasmatico. In seguito la fusione dell'autofagosoma con un lisosoma comporta la formazione di un autolisosoma dove il materiale catturato, insieme con la membrana interna, viene degradato (Fig. 15). L'autofagia si verifica praticamente in tutte le cellule a bassi livelli basali per svolgere funzioni omeostatiche e fisiologiche, come per il turnover di proteine e organelli, ed è regolata a livello molecolare da numerosi e differenti segnali biochimici, come dalle proteine del tipo ATG che formano diversi complessi che regolano fasi distinte dell'autofagia. Il fenomeno si sovraregola rapidamente quando le cellule hanno bisogno di generare nutrienti intracellulari ed energia, per esempio, durante il digiuno, il ritiro di fattori di crescita, o alte richieste di bioenergetiche. L'autofagia è anche sovraregolata quando le cellule si stanno preparando a sottoporsi a rimodellamento strutturale, o quando cercano di liberarsi di componenti citoplasmatici danneggiati, per esempio, durante lo stress ossidativo, infezioni, o

accumulo di aggregati proteici. Lo stato nutrizionale, i fattori ormonali, e altri fattori come la temperatura, le concentrazioni di ossigeno, la densità delle cellule sono importanti nel controllo di autofagia. La cascata molecolare che regola ed esegue l'autofagia è stata oggetto di recenti recensioni complete (Klionsky, 2007; Maiuri et al, 2007a;. Mizushima e Klionsky, 2007; Rubinsztein et al., 2007). Uno dei regolatori chiave del processo autofagico è la TOR-chinasi, che è il principale segnale inibitorio che regola l'autofagia in presenza di fattori di crescita e abbondanza di nutrienti. A valle di TOR-chinasi, sono stati identificati più di 20 geni (noti come i geni ATG) che codificano proteine che sono essenziali per la esecuzione dell'autofagia (Mizushima e Klionsky, 2007)(Fig.15). Queste includono un complesso proteico che risponde ai segnali a monte, come TOR chinasi; un complesso di segnalazione chinasi lipidica che media la enucleazione della vescicola; sistemi che mediano l'espansione delle vescicole; una via di riciclo che media la demolizione delle stesse proteine Atg degli autofagosomi maturi; le permeasi vacuolari che consentono l'efflusso di amminoacidi dal compartimento di degradazione.

L'identificazione dei segnali che regolano l'autofagia e dei geni che eseguono l'autofagia hanno facilitato l'individuazione e la manipolazione della via autofagica. Le funzioni fisiologiche

dell'autofagia comprendono: la difesa contro lo stress metabolico; il ruolo come housekeeper cellulare; La funzione di guardiano del genoma; La decisione della vita o della morte della cellula. L'autofagia viene attivata come un processo adattivo catabolico in risposta alle diverse forme di stress metabolico, compresa la privazione di nutrienti, l'esaurimento di fattori di crescita, e l'ipossia. Questo processo di degrado genera amminoacidi liberi ed acidi grassi che possono essere riciclati. Presumibilmente, gli amminoacidi prodotti sono utilizzati per la sintesi de novo di proteine che sono essenziali per l'adattamento allo stress, ed insieme agli acidi grassi usati per mantenere la produzione cellulare di ATP. Un aumento della velocità autofagica si verifica in risposta a segnali di stress, con conseguente aumento dell'accumulo di materiale da degradare negli autofagosomi e negli autolisosomi per garantire il successo dell'esecuzione delle funzioni adattive fisiologiche dell'autofagia. In alcuni stati di malattia o con il trattamento con inibitori lisosomiali, vi è una riduzione sulla velocità dell'autofagia e conseguente ridotta degradazione lisosomiale degli autofagosomi. Ciò si traduce in un aumento dell'accumulo autofagosomiale ed una con conseguenze fisiopatologiche avverse connesse al mancato completamento della via autofagica. Una diminuita velocità autofagica si osserva anche

se il segnale di attivazione è difettoso o se sono presenti mutazioni nei geni ATG. Anche in quest'ultimo caso il risultato è un minore

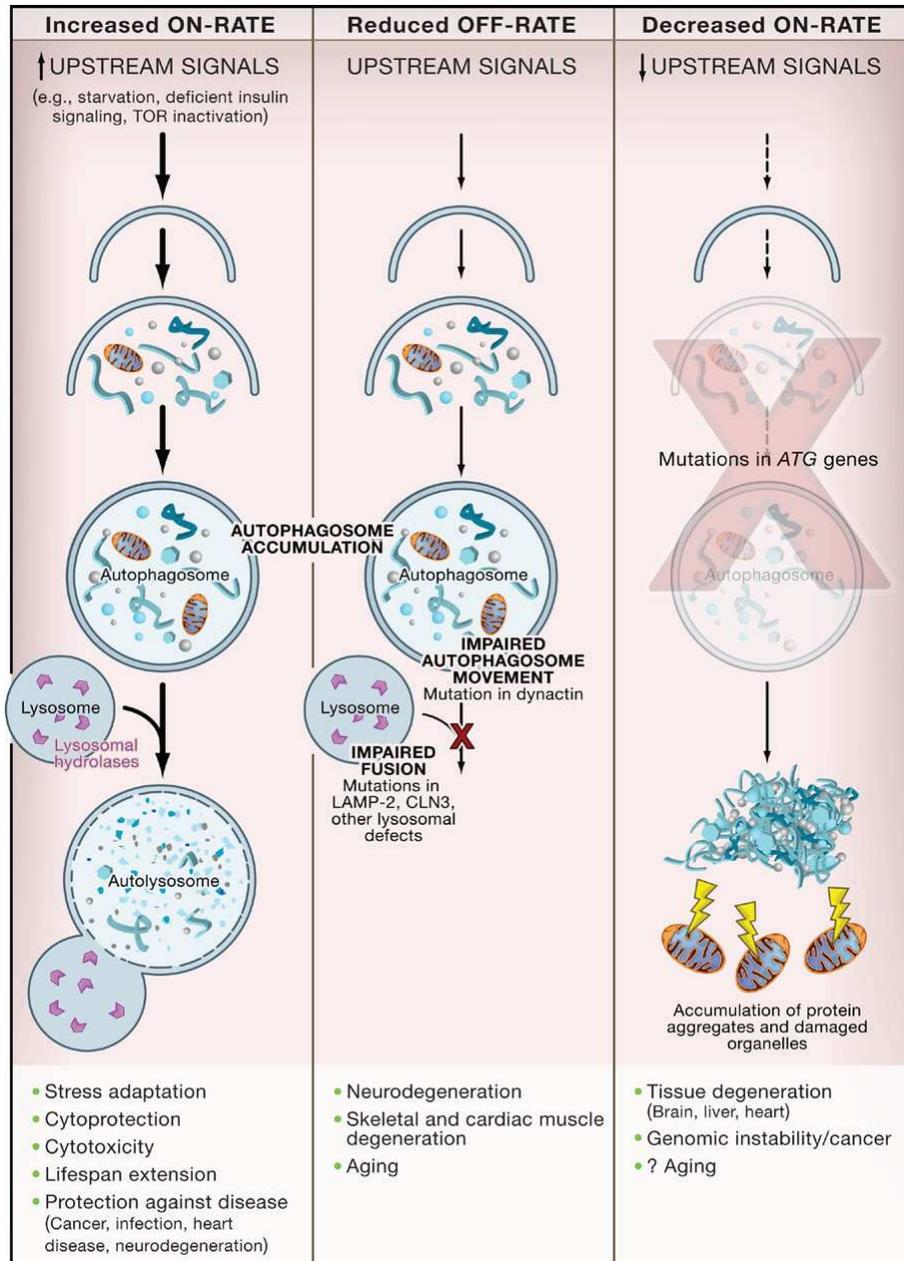


Figura 16. Alterazioni di fasi diverse del processo autofagico

accumulo autofagosomiale ed un conseguente accumulo di aggregati proteici ed organelli danneggiati, con conseguenze fisiopatologiche connesse al deficit del turnover di proteine e

organelli cellulari. Le conseguenze fisiologiche e fisiopatologiche descritte per un aumento o per una diminuita velocità della via autofagica sono basate su studi eseguiti su organismi modello knockout per i geni ATG (Fig. 16). Per quanto riguarda il ruolo come housekeeper cellulare le funzioni svolte dall'autofagia comprendono l'eliminazione delle proteine ed organelli difettosi, la prevenzione accumulo di aggregati proteici anomali, e l'eliminazione degli agenti patogeni intracellulari. Normalmente le proteine sono rimosse da diversi sistemi di degradazione delle proteine, compreso il sistema ubiquitina-proteosoma (UPS), l'autofagia Chaperonine-mediata (CMA), e la macroautofagia (qui nota come "autofagia"). Il sistema macroautofagico è l'unico in grado di degradare organelli interi come mitocondri, perossisomi, e l'ER, nonché microrganismi intracellulari integri. Inoltre, è di grande importanza il ruolo del sistema dell'autofagia lisosomiale di controllo della qualità delle proteine, ossia, la prevenzione dell'accumulo intracellulare di proteine alterate. Anche in questo caso mutazioni tessuto-specifiche dei geni ATG hanno rivelato un ruolo critico nel controllo del processo autofagico. Tali funzioni sono fondamentali per la protezione contro l'invecchiamento, il cancro, le malattie neurodegenerative, e le infezioni.

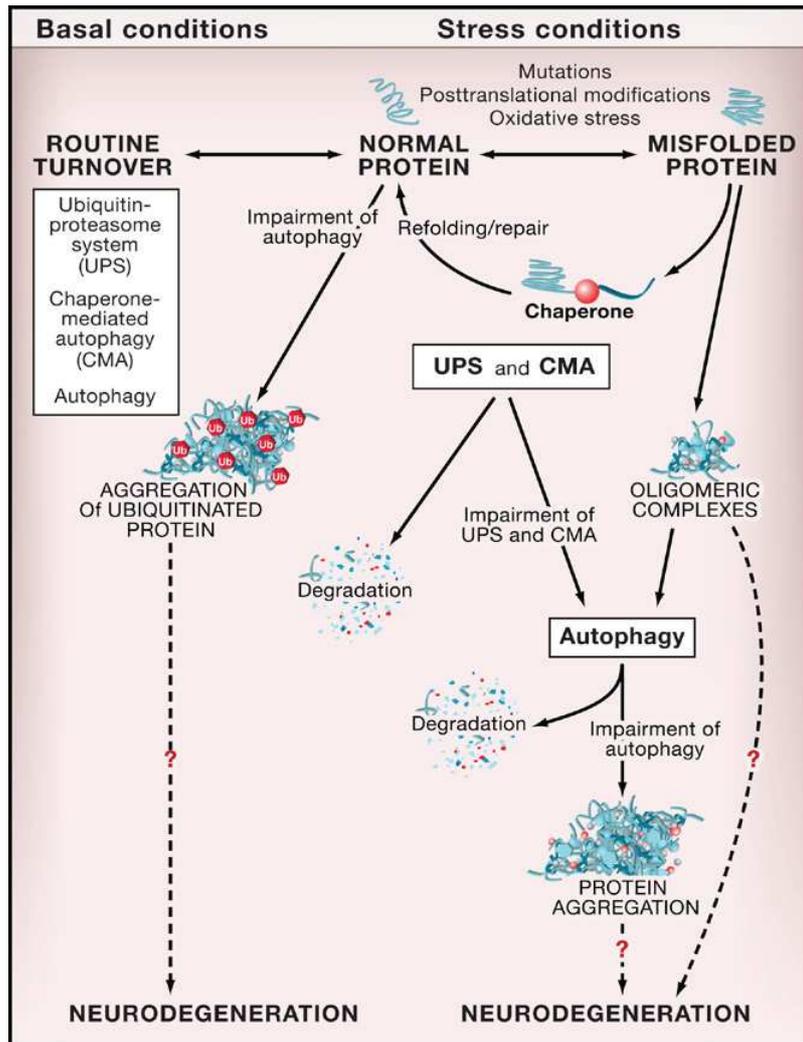


Figura 17. controllo autofagico della qualità delle proteine

Recenti studi condotti su cellule epiteliali deficienti per i geni ATG indicano che il processo autofagico può limitare i danni al DNA e l'instabilità cromosomica (Mathew et al., 2007a). Non è ancora chiaro se l'autofagia svolge una funzione primaria nel prevenire l'instabilità genomica nelle cellule in condizioni normali. Tuttavia, in considerazione delle note funzioni nel regolare l'omeostasi energetica e nel controllo qualità delle proteine e degli organelli, sembra probabile che l'autofagia abbia un ruolo di primaria

importanza come guardiano del genoma. Tale ruolo avrebbe effetti sulla prevenzione del tumore, la progressione del tumore, l'invecchiamento e la neurodegenerazione. (Jin e White, 2007;) (Fig.17). Nella maggior parte dei casi, l'autofagia costituisce un percorso di adeguamento allo stress che promuove la sopravvivenza cellulare. Un apparente paradosso è che l'autofagia è anche considerato una forma di via che conduce alla morte cellulare programmata non apoptotica denominato "tipo II" o morte cellulare "Autofagica". Questo tipo di morte cellulare è stata storicamente definita con criteri morfologici, ma è ormai chiaro che la semplice presenza di autofagosomi in cellule morienti è insufficiente a distinguere tra la "morte cellulare con autofagia" dalla "morte cellulare per autofagia". Anche in questo caso il knockdown dei geni ATG ha recentemente definito come l'autofagia funzioni, nell'esecuzione della morte cellulare in diversi contesti (cfr. Maiuri et al., 2007a). Non è ancora chiaro quali fattori determinano quando autofagia è citoprotettiva e quando è citotossica e se la citotossicità si verifica come il risultato di auto-cannibalismo, quali sono le vie specifiche di degrado dei fattori citoprotettivi, o di altri ancora meccanismi non definiti (Maiuri et al., 2007a). Il più intuitivo meccanismo è l'auto-cannibalismo. Tuttavia, le cellule sottoposte a privazione prolungata di fattori di crescita o carenza di ossigeno e

glucosio possono perdere la maggioranza della loro massa tramite autofagia e recuperare pienamente, quando sono immessi in ottime condizioni di coltura (Degenhardt et al., 2006; et Lum al., 2005), suggerendo che la morte cellulare attraverso autofagia non può essere semplicemente una questione di superamento di una soglia quantitativa dell'auto digestione. Sebbene l'autofagia può influenzare indipendente le decisioni di vita o di morte della cellula (essendo sia citoprotettiva che autodistruttiva), è anche intrinsecamente legata alla morte per apoptosi. Oggi, con l'individuazione, dei processi che regolano l'autofagia, dei prodotti genici evolutivamente conservati che mediano autofagia, e con i metodi che permettono di distinguere tra un'aumentata o diminuita velocità autofagica, tramite approcci farmacologici, genetici, biochimici si può ridefinire il ruolo dell'autofagia nella patogenesi di alcune malattie umane.

La via autofagica è usata anche nella difesa contro i microbi, compresa la distruzione selettiva di microrganismi tramite i lisosomi, il processo viene denominato xenofagia, così gli acidi nucleici microbici e gli antigeni vengono consegnati ai compartimenti endo/lisosomiali per l'attivazione dell'immunità innata e adattiva (Levine e Deretic, 2007; Schmid e Munz, 2007) (Figura 18). Numerosi importanti agenti patogeni sono degradati in

in vitro tramite xenofagia, compresi i batteri come lo *Streptococcus* gruppo A, *Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella flexneri*,

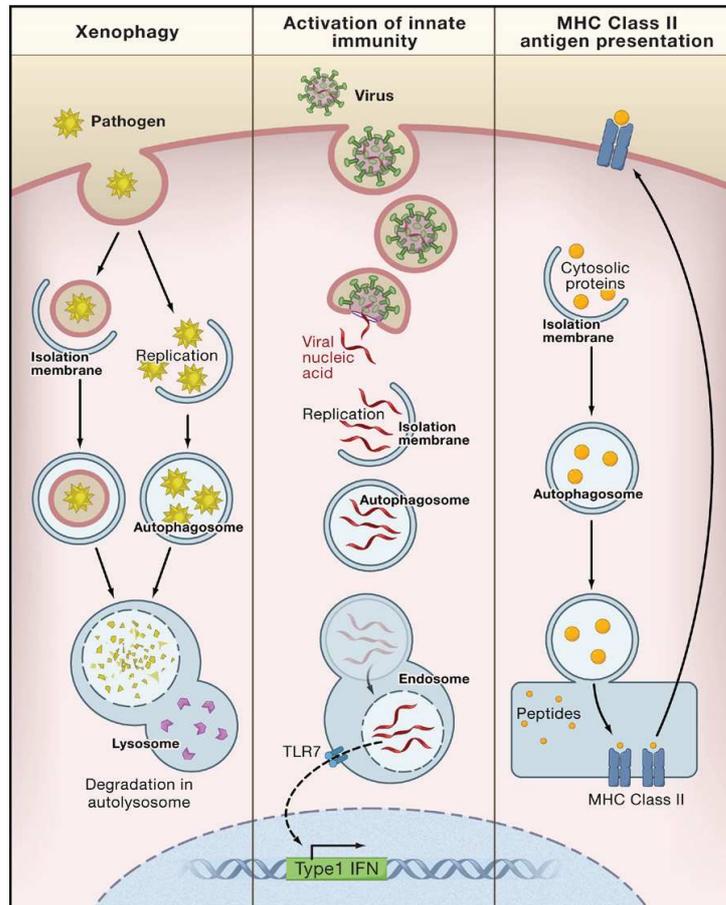


Figura 18: Autofagia nell'Immunità innata e adattiva

Salmonella enterica, *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*; virus come herpes simplex di tipo I (HSV-1); e parassiti come *Toxoplasma gondii*. Si prevede che la xenofagia partecipi alla protezione degli agenti patogeni in vivo, ma i dati a sostegno sono limitati (Levine e Deretic, 2007). Nella xenofagia, i patogeni intracellulare (batteri, protozoi e virus) che sono o nel citosol o all'interno di vacuoli contenenti gli agenti patogeni

vengono circondati da membrane d'isolamento, che inglobate negli autofagosomi, vengono degradate all'interno degli autolisosomi. Con la disponibilità di topi knockout per i geni ATG tessuto-specifici, dovrebbe essere possibile valutare più in generale il ruolo della xenofagia nella patogenesi microbica. L'Autofagia può essere coinvolta nella attivazione dell'immunità innata consegnando gli acidi nucleici virali ai compartimenti endosomiali contenenti il recettore Toll-like7 (TLR7), che segnala l'induzione della produzione interferone di tipo 1 (IFN). L'Autofagia può essere coinvolta anche nell'immunità adattativa consegnando antigeni microbici sintetizzati endogenamente ed auto-antigeni agli endosomi, dove vengono caricati su molecole MHC di classe II per la presentazione alle cellule T CD4+ (Fig. 18). E' possibile che difetti del processo autofagico possano contribuire alla patogenesi di malattie autoimmuni. Diversi e recenti studi GWA hanno scoperto una forte associazione genetica tra geni coinvolti nell'esecuzione dell'autofagia come IRGM1, ATG16L1, e la suscettibilità alla malattia di Crohn. Questi studi suggeriscono un potenziale ruolo della deregolamentazione dell'autofagia nella patogenesi della malattia di Crohn. Il gene ATG16L1 codifica per una proteina di 44 kD, autophagy-related 16-like 1, che risulta essere un componente chiave del processo autofagico. La proteina

ATG16L1 si pensa essere essenziale per l'interazione con altre proteine autofagiche come ATG5 and ATG12 e media interazioni proteiche che generano aggregati stabili che coordinano la formazione degli autofagosomi. ATG16L1 è espresso in cellule epiteliali intestinali, così come nelle cellule APCs; and CD4+, CD8+, CD19+ e nelle cellule T primitive. ATG16L1 è implicato nel processamento di batteri intracellulari come dimostrato dalla diminuita velocità autofagica per *Salmonella typhimurium* in cellule HeLa cells Knockdown per ATG16L1. Gli studi GWA su CD hanno messo in evidenza una forte associazione tra la CD e la variante amminoacidica in cui una treonina viene sostituita con alanina (Thr300Ala A~G). E' interessante notare che , non è stata osservata associazione nella UC. Nel loro insieme, gli studi sull'associazione di ATG16L1 con la CD risultano ben replicati, rappresentano una specifica associazione e suggeriscono che autofagia e le risposte della cellula ospite verso microrganismi intracellulari sono coinvolti nella patogenesi di CD. Tuttavia, al momento, non è noto se la variante del gene ATG16L1 (T300A) è difettosa nella funzione autofagica e se tale collegamento genetico è indicativo di un ruolo di base sui meccanismi di alterazione autofagica nella patogenesi della malattia di Crohn. I meccanismi patogeni della malattia di Crohn non sono stati compresi ancora

completamente, ma è stato ipotizzato il coinvolgimento una sregolata risposta immunitaria verso batteri commensali intestinale, l'alterazione della funzione barriera della mucosa, e/o difetti della clearance batterica (Baumgart e Cardatura, 2007). Si è di recente speculato che il deficit autofagico potrebbe contribuire ad uno o più di questi meccanismi patologici della malattia di Crohn (Levine e Deretic, 2007). Studi su topi mutanti con la soppressione del gene ATG16L e altri geni ATG dovrebbero contribuire a chiarire le potenziali interrelazioni tra le alterazioni nell'autofagia e la patogenesi della malattia di Crohn.

SCOPO DELLA TESI

Recentemente, si è verificato un progresso significativo nella nostra comprensione delle varianti genetiche associate con le IBD, in particolare attraverso di Genome-wide scan association (gwa). Questi studi hanno drasticamente aumentato il numero di associazioni genetiche, mostrando modelli ben replicati nelle IBD. Tra i 30 loci associati con CD, le varianti genetiche di NOD2/CARD15, IL23R e ATG16L1 sono quelle che hanno l'associazione più forte con il rischio di malattia. Diversi studi di associazione genetica su diverse aree geografiche hanno mostrato risultati simili. In modelli animali, i Th17, sottoinsieme delle cellule T è stato dimostrato mediare condizioni infiammatorie croniche e autoimmuni, con un ruolo centrale per l'IL-23 nello sviluppo di malattia intestinale. Il gene per IL-23r codifica per una subunità del recettore del recettore di IL-23, che svolge un ruolo sia nella immunità innata che adattiva. Gli Studi di gwa hanno mostrato un significativa associazione tra malattia Crohn (CD) e la variante per gli aminoacidi Arg381Gln nel gene per IL-23r. I dati relativi la variante Arg381Gln dimostrano che l'allele meno comune, codificante per la glutamina, conferisce protezione da CD. Il gene ATG16L1 codifica per una proteina importante nel processo

autofagico. Anche in questo caso Gli studi GWA su CD hanno messo in evidenza una forte associazione tra la CD e la variante amminoacidica in cui una treonina viene sostituita con alanina (Thr300Ala A~G). Nelle aree del Mediterraneo i dati sul rischio genetico riguardo la CD sono scarse e discordanti. Le mutazioni riguardanti NOD2/CARD15 sono frequenti in Spagna e Sicilia, mentre sono rare in Tunisia, Grecia e Turchia.

Per quanto riguarda la mutazione IL23R, a nostra conoscenza, i dati sono stati pubblicati solo dalla Spagna e Sicilia che conferma il ruolo protettivo della mutazione verso la suscettibilità alla CD e fino ad oggi, non ci sono dati su questa associazione nell'area sud del Mediterraneo. Per quanto la mutazione ATG16L1 T300A, i dati nel Mediterraneo della Spagna e dell'Italia (12 -13) mostrano un aumento del rischio di CD nei pazienti con questa variante. La Sicilia è una zona in cui vi è un'alta incidenza di CD (6.6/100, 000) in confronto con altre aree vicine come Malta e la Tunisia, in cui l'incidenza è bassa. Con i nostri studi stiamo indagando il ruolo della genetica nella spiegazione questa alta incidenza. In questa tesi si riportano i risultati di uno studio genetico sulla malattia di Crohn in cui i 3 geni ad oggi più rappresentativi coinvolti nella suscettibilità per CD (NOD2/CARD15, IL23R e ATG16L1) sono stati studiati in una

popolazione siciliana. Sono state attenzionate anche le possibili interazione tra questi geni. I dati sulla relazione tra mutazioni genetiche e fenotipo in CD riguardanti principalmente le mutazioni di NOD2 sono utili per la comprensione del ruolo della genetica sul comportamento della malattia, quindi abbiamo preso in considerazione la relazione tra geni e caratteristiche cliniche. Queste conoscenze permetteranno di migliorare la comprensione delle meccanismi fisiopatologici necessari per sviluppare nuovi interventi terapeutici. Utile a questo proposito sarebbe l'integrazione tra gli studi di popolazione umani e studi condotti su modelli murini mutanti rilevanti per le IBD.

MATERIALI E METODI

CAMPIONAMENTO

Per questo lavoro sono stati reclutati un totale di 279 pazienti con diagnosi di Malattia di Crohn provenienti dal servizio di gastroenterologia dell' Unità operativa di Medicina I dell' Ospedale V. Cervello di Palermo e 149 soggetti non affetti da alcuna patologia usati come controlli sani. La diagnosi di malattia di Crohn è stata stabilita secondo parametri clinici convenzionali, radiologici, endoscopici ed istopatologici.

In tutti questi soggetti è stato effettuato lo studio molecolare per la ricerca della mutazioni più significativa dei geni NOD2/CARD15, IL23R e ATG16L1.

ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO

Il DNA genomico necessario per lo studio è stato isolato dalle cellule bianche del sangue periferico, ottenuto tramite prelievo venoso di sangue in EDTA. Dopo un lavaggio del sangue con soluzione fisiologica e successiva centrifugazione a 3000 rpm, dopo decantazione del surnatante, il corpo di fondo, composto da emazie, globuli bianchi e proteine plasmatiche residue, è stato congelato a -20°C over-night(O/N); l'emolisi è stata completata dopo scongelamento del campione, aggiungendo 5 ml di una soluzione di MgCl₂ 5 mM e Nonidet al 10%. Il pellet di nuclei, ottenuto dopo agitazione e centrifugazione a 9000 rpm, è stato sottoposto ad incubazione O/N a 55-65°C dopo aggiunta di 5ml di soluzione tampone salina STE, 50 µl di SDS al 20% e 125 µl di proteinasi K 10mg/ml.

IL DNA genomico è stato ottenuto in forma pura tramite estrazione con solvente fenolo-cloroformio. In fine dopo aggiunta di 500 µl di acetato di sodio 3 M si è eseguita la precipitazione del DNA con etanolo assoluto freddo, quindi si è raccolto per spooling e risospeso in acqua sterile.

Ogni campione è stato lasciato O/N a 4°C per favorirne la dissoluzione in acqua e poi quantizzato spettrofotometricamente per

stabilirne la concentrazione in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e la purezza in base al rapporto tra DNA/proteine residue.

La misura della concentrazione viene eseguita allo spettrofotometro utilizzando due lunghezze d'onda diverse nel campo degli UV:

- 280 nm per misurare la concentrazione delle proteine;
- 260 nm per misurare la concentrazione di acidi nucleici.

L'assorbimento della luce UV è data dalla presenza, negli acidi nucleici di basi puriniche e pirimidiniche in quanto componenti aromatiche e alla lunghezza d'onda di 260 nm si ha il massimo assorbimento da parte di queste molecole.

La purezza del campione si valuta calcolando il rapporto tra la densità ottica (OD) a 260 nm e la OD a 280 nm: il valore ottimale deve essere compreso tra 1.5 e 1.8; un valore inferiore indica la presenza di contaminazione proteica.

Alla fine la concentrazione di DNA espressa in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ viene determinata usando la formula di Lambert-Beer per la quale:

$$[\text{DNA}] = \frac{A}{e \cdot l}$$

dove: A = assorbanza

e = coefficiente di estinzione molare

l = cammino ottico della cella.

la qualità di alcuni campioni è stata valutata anche mediante elettroforesi su gel di agarosio e colorazione con etidio bromuro (colorante DNA affine). Su un gel di agarosio all'uno per cento viene deposto qualche μl del DNA a estratto e lasciati migrare qualche minuto. Dopo esposizione del gel agli UV (che vengono assorbiti dall'etidio bromuro intercalato al DNA e riemessi poi come fluorescenza) è possibile confrontare l'intensità di emissione dei diversi campioni e stimarne anche la qualità.

ANALISI GENETICHE:

Il DNA genomico estratto è stato analizzato con l'ausilio di diverse metodiche in base alle mutazioni da individuare, in particolare sono state utilizzate le seguenti tecniche:

- Digestione Enzimatica diretta su frammenti di PCR.
- Ibridazione con oligosonde specifiche, reverse dot-blot (RDB)
- Sequenziamento genico diretto su frammenti di PCR

PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Il DNA genomico estratto è stato analizzato con l'utilizzo di diverse metodiche di biologia molecolare. Per riconoscere la variante puntiforme Arg381Gln sul gene del'IL23r, quella Thr300Ala sul gene ATG16L e la R702W sul gene NOD2 è stata utilizzata la tecnica della PCR-RFLP. La tecnica di base utilizzata è la PCR (Polymerase Chain Reaction), indicata come una delle scoperte più importanti del '900. Tale metodica, ideata da Kary Mullis nel 1985, è in grado di produrre numerose copie di una specifica sequenza nucleotidica partendo da un segmento di DNA bersaglio o target. Essa è un'ottima tecnica, infatti non solo, permette l'amplificazione in vitro di frammenti di DNA senza il trasferimento in cellule viventi, inoltre rileva con una specificità molto elevata, concentrazioni estremamente basse di sequenze di

DNA target. I Primers utilizzati per l'amplificazione della regione contenente la mutazione sono stati disegnati nel nostro laboratorio. Per la variante R702W sull' E4 di NOD2/CARD15 i primers erano:

- forward 5'-ACC TTC AGA TCA CAG CAG CC-3', reverse 5'GCT CCC CCA TAC CTG AAC AG-3'; per IL23R: forward 5'-TGA GCA GAG TAA AGA GAA TAG-3', reverse 5'-TGG TGA TAC ATA ATC ATG TAG T-3'; e per ATG16L: forward 5'-TCC TGT CTA ATA TTT GTC TTT ATG T-3', reverse 5'CCT CAC TTC TTT ACC AGA ACC AGG AT-3'.

Le sequenze dei frammento amplificati possedevano un sito riconoscibile da uno specifico enzima di restrizione, rispettivamente Xcm I per IL23R, MWO1 per ATG16L e MSP1 pe R702W, utilizzato per la successiva analisi dei frammenti di restrizione. Ogni reazione di PCR è stata allestita in un volume finale di 100 µl della miscela di reazione, utilizzando 0,5-1 mg di DNA, 1,5 mM di MgCl₂, 4 µl di dNTPs (40 mM), 1X reaction buffer, 1mM di primer sense ed 1mM di primer antisense, e 2,5 U di *Taq* polimerasi. Le reazioni di amplificazione sono state eseguite con un termociclatore Biorad. Ogni reazione di amplificazione è stata iniziata con uno step di Denaturazione termica Consiste della doppia elica di DNA a 95°C per il DNA genomico umano, per 5 minuti. A questo ciclo ne seguono altri 30 ognuno dei quali comprende uno step di 30

secondi a 95 °C; 1 minuto a 55°C chiamato annealing, cioè Ibridazione del primer al bersaglio (T° scelta a seconda della natura e della T_m , melting temperature, dei primers); 1 minuto di Estensione (sintesi del DNA) a 72°C temperatura ottimale per il funzionamento della Taq polimerasi; la reazione di PCR viene conclusa con un ciclo di Estensione finale di 10 minuti a 72°C. I prodotti PCR sono stati testati successivamente mediante elettroforesi in gel di agarosio al 2% e visualizzati agli UV dopo colorazione con etidio bromuro, per verificare se la lunghezza del frammento di DNA amplificato corrisponda con quello atteso. Come marker di riferimento è stato utilizzato il Φx 174 digerito con l'enzima HaeIII. Successivamente si è eseguita la digestione enzimatica del frammento di DNA amplificato tramite una specifica endonucleasi di restrizione. Questa metodica richiede l'utilizzo di un enzima di restrizione in grado di riconoscere selettivamente o la sequenza mutata o quella normale del prodotto di amplificazione. Dopo la digestione si ottengono frammenti di lunghezza diversa a seconda della presenza o dell'assenza della variazione della sequenza dei nucleotidi. I frammenti vengono separati mediante elettroforesi, in modo da ottenere un pattern di bande che sarà diverso a seconda che il polimorfismo sia presente in omozigosi od in eterozigosi o assente.

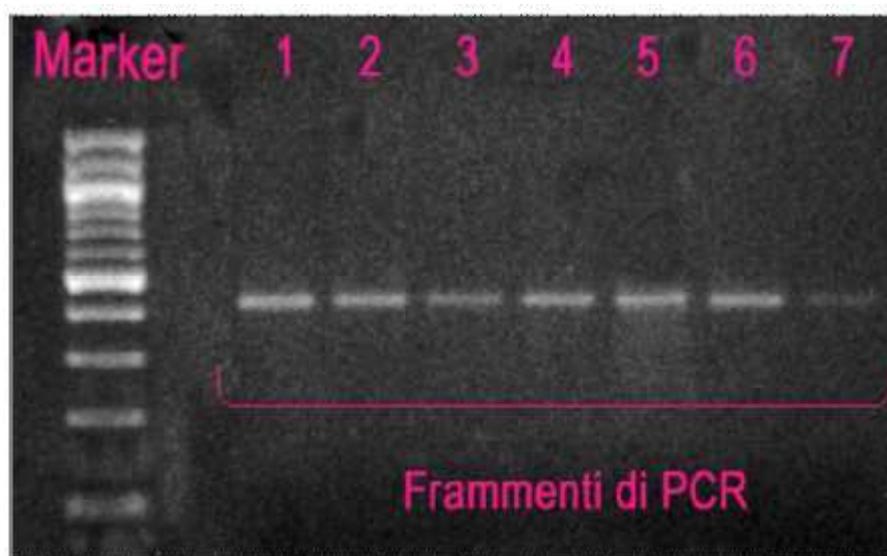


Figura 10: Corsa elettroforetica in gel di agarosio

La reazione enzimatica diretta su frammento di PCR specifico per l'individuazione della mutazione Arg381Gln, G \rightarrow A, del gene IL23r, è stata effettuata a 37°C O/N con l'enzima XcmI, per R702W con MSP1 a 37°C O/N mentre per ATG16L1 a 60°C con O/N con l'enzima MWO1(New England Biolabs, Beverly, Ma); la reazione aveva un volume finale di 30 ml e la miscela di reazione conteneva 20 μ l circa di prodotto di PCR, 30 U di enzima e 3 μ l di reaction buffer. I frammenti di restizione sono stati separati con elettroforesi su gel di poliacrilammide al 6%. In caso della presenza di un allele mutato, il frammento di PCR, viene tagliato in frammenti di diversa lunghezza, rispetto all'allele non mutato.

I frammenti vengono visualizzati ponendo, dopo la migrazione elettroforetica, il gel di poliacrilammide in soluzione di etidio bromuro ed, illuminando il gel con raggi UV generati dal transilluminatore.

SEQUENZIAMENTO GENICO

Il sequenziamento dei frammenti di DNA amplificati permette di identificare l'ordine sequenziale delle basi nucleotidiche all'interno di un frammento di DNA. Il metodo storicamente utilizzato in principio, si basò su quello enzimatico ideato da Sanger nel 1976.

Attualmente per il sequenziamento del DNA il metodo usato è quello di Sanger modificato (Wilson *et al.*, 1990) in cui vengono impiegate anche procedure automatizzate e l'uso della fluorescenza. Il sequenziatore automatico da noi utilizzato, della Beckman, prevede che la migrazione elettroforetica venga condotta su capillare. Con questa tecnica, si prevede che il DNA da analizzare sia un singolo filamento per cui si deve eseguire una reazione di amplificazione su un frammento di DNA proveniente da una precedente PCR, e nella miscela di reazione è necessario aggiungere un solo primer di sequenziamento complementare, che si leghi specificatamente ad una regione del DNA stampo che fiancheggia la porzione di cui si vuole determinare la sequenza. Si effettua così una reazione di amplificazione mediata dalla DNA

polimerasi in cui s'incorporano dei nucleotidi modificati, i 2.,3.-didesossinucleotidi trifosfato (ddNTPs), carenti dell'estremità 3.OH, che bloccano il filamento di DNA nascente. Si producono così una serie di catene di DNA di lunghezza progressivamente maggiore, a seconda del punto in cui è avvenuta l'incorporazione. Tutti questi filamenti che differiscono tra loro anche per un solo nucleotide e che terminano ognuno con uno dei quattro ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP), possono essere separati per elettroforesi su un gel di poliacrilamide e individuabili mediante l'incorporazione di gruppi marcati nei prodotti di reazione. Per poter distinguere con quale base termina ogni filamento, i quattro ddNTPs forniti sono marcati con fluorocromi diversi. Si tratta di fluorocromi composti, contenenti una molecola donatrice fluoresceinata legata, tramite un *linker*, ad una molecola di diclororodamina (dRhodamine) accettrice. I quattro terminatori assorbono alla stessa lunghezza d'onda corrispondente al massimo di eccitazione della diclororodamina, ed emettono a lunghezza d'onda diversa a seconda della molecola accettrice alla quale ognuno è legato. La molecola *linker* assicura il trasferimento ad alta efficienza. Durante l'elettroforesi, un monitor individua e registra il segnale fluorescente man mano che il DNA passa attraverso un determinato punto del gel. Il risultato consiste nella forma dei

profili d'intensità di ciascuno dei fluorofori (differentemente colorati) e nel contemporaneo immagazzinamento elettronico dell'informazione. Per l'interpretazione dei dati si utilizzano alcuni software che permettono una migliore analisi dei picchi (Sequencing Analysis). Nel nostro laboratorio il sequenziamento è stato messo in atto con l'utilizzo di un sequenziatore automatico ad 8 capillari. Il DNA è stato amplificato tramite reazione di PCR con volume finale di 50 µl. La miscela di reazione conteneva 200 ng di DNA genomico, 1,5 mM di MgCl₂, buffer reaction 1X, dNTPs 0,2 mM ognuno, 30 pmoli di primer sense e 30 pmoli di primer antisense e 2,5 U di Taq polimerasi. I cicli di denaturazione, appaiamento ed allungamento sono gli stessi dell'PCR preparativa per la restrizione enzimatica. Una volta quantificato il prodotto di PCR, su gel di agarosio al 3% mediante confronto con 1 µg di Φx 174 digerito con l'enzima HaeIII,

Il processo di sequenziamento vero e proprio è preceduto da diverse fasi. Il prodotto di PCR viene sottoposto prima ad una reazione di purificazione chiamata EXOSAP, digestione enzimatica con esonucleasi, che permette di eliminare eventuali residui di dNTPs, di oligonucleotidi e di eventuali altre strutture ad elica singola presenti negli amplificati. La quantità di amplificato da digerire di solito varia tra 1 µl e i 3 µl (in modo da avere 60-80 ng

di DNA) e viene stimata in base all'osservazione dell'intensità delle bande degli amplificati corsi precedentemente su gel di agarosio. La digestione avviene ad opera dei due enzimi idrolitici Sap (Shrimp Alkaline Phosphatase) ed Exo (Exonuclease I). Il protocollo prevede di preparare per ogni reazione una miscela contenente: 1 - 3 ml di DNA, 5 U di Sap, 2 U di Exo, H₂O fino ad un volume finale di 5 µl. La fase successiva è rappresentata dall'incubazione in termociclatore: 60 minuti a 37°C (temperatura utile per l'attivazione di Exo e Sap) seguita da 15 minuti a 85°C (per inattivare i due enzimi, a digestione avvenuta).

La marcatura dell'amplificato precedentemente digerito,

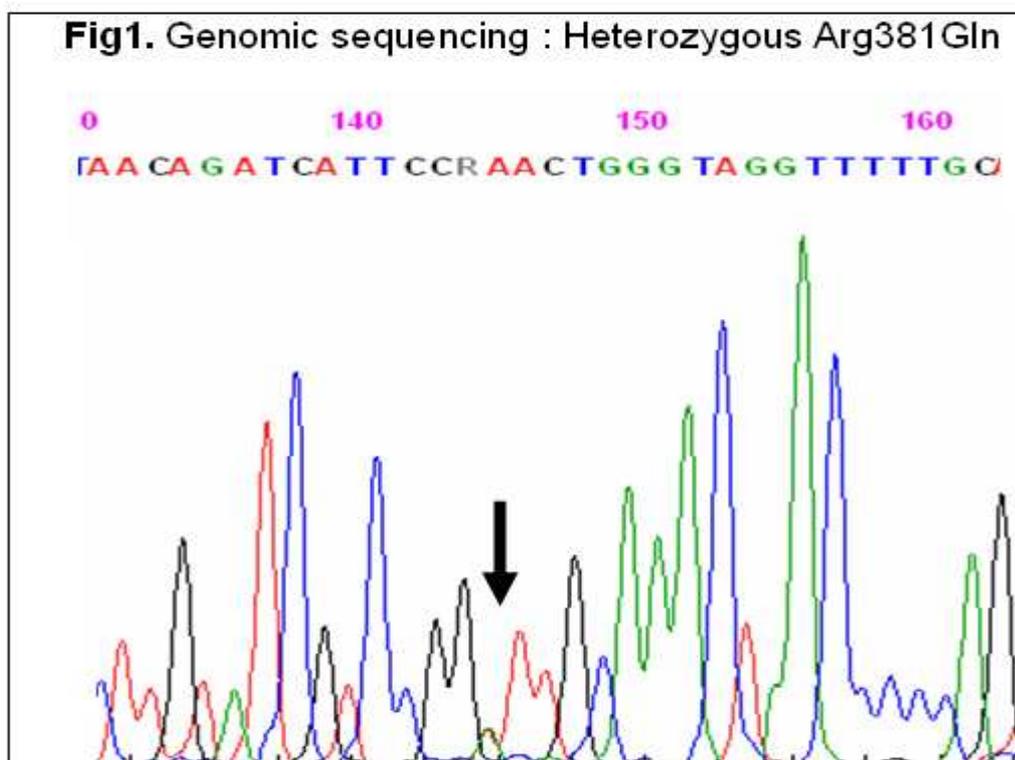


Fig. 11 - Risultato del sequenziamento genico del gene IL23r. Il campione risulta eterozigote per la variante allelica Arg381Gln, (G → A)

viene chiamata reazione di Cycle Sequencing. Vengono utilizzati circa 13-40 ng di prodotto di amplificazione pari a 100 fmoli (per frammenti di lunghezza compresa tra 200 e 600 bp). La miscela di reazione per il Cycle Sequencing ha un volume finale di 20 µl e contiene oltre ai 5 µl di Exo-Sap, 0,2 mM di primer di sequenza, ed 8 µl di master Mix fornita dal kit della Beckman composta da reaction buffer 1X, DNA polimerasi, dNTPs ed i ddNTPs terminatori marcati con i fluorocromi. La reazione di Cycle Sequencing consta di 25 cicli composti da una fase di denaturazione, 20 secondi a 95°C, una di appaiamento di 20 secondi a 50°C ed una di 4 minuti a 60°C. Il prodotto di questa amplificazione poi è stato precipitato con etanolo assoluto freddo e risospeso in 40 µl di SLS (sample loading solution) per la successiva analisi al sequenziatore. Durante la separazione che avviene mediante una elettroforesi capillare, le emissioni fluorescenti vengono rilevate e registrate come dei cromatogrammi in cui i picchi di diverso colore indicano i nucleotidi della sequenza nucleotidica del frammento in analisi.

IBRIDAZIONE CON IL REVERSE DOT BLOT

Con il reverse dot-blot vengono analizzate le mutazioni G908R e L1007InsC del gene NOD2/CARDI5.

La PCR preparativa per il RDB. è stata eseguita utilizzando il medesimo protocollo della PCR preparativa per la restrizione enzimatica con l'aggiunta di 1 u di dUTP coniugato con la biotina, una vitamina che servirà per la rivelazione dell' avvenuta ibridazione. I cicli di denaturazione, appaiamento e allungamento sono gli stessi della PCR per la restrizione enzimatica. I primers di PCR e le oligosonde per l' ibridazione sono state disegnate nel nostro laboratorio.

Le oligosonde (probes) amminomodificate specifiche per gli alleli mutati e normali sono state legate ad una membrana di nylon attivata con ethyl-3-(3dimethylamino-propyl)carbodiimide (EDC) tramite la formazione di un legame ammidico tra i gruppi carbossilici presenti nella membrana ed i gruppi amminici presenti al 5' terminale delle oligosonde.

Dopo la semina un lavaggio in NaOH 0,1 M permette di saturare i gruppi COO⁻ della membrana rimasti liberi.

I prodotti di PCR biotinilati sono stati ibridati in 2x SSC-I % SDS per 1h a 45° C. L'avvenuta ibridazione viene rivelata con il sistema

biotina-streptavidina. Al termine della reazione di ibridazione le strips ibridate vengono lavate con 2x SSC-1% SDS per 15' a 45°, quindi poste a contatto, per 45' a temperatura ambiente, con una soluzione 2x SSC-1 % SDS contenente 5 unità di streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina. L'eccesso di streptavidina presente in soluzione è stato allontanato con 2 lavaggi in 2x SSC-1 % SDS. Se è avvenuta una ibridazione tra sonda specifica e DNA genomico amplificato sulla superficie della membrana si formerà un "sandwich" formato da: oligoprobe legato alla membrana-DNA amplificato con biotina-streptavidina coniugata con la fosfatasi alcalina. La rivelazione dell'ibridazione avviene in presenza di una miscela di cromo geni, NBT (Nitro-Blue Tetrazolo) e BICP (5-Bromo-4-Cloro-3'-Indolofosfato) contenenti gruppi fosfato che fungono da substrato per la fosfatasi alcalina. L'incubazione della reazione di rivelazione necessita di assenza di luce e si sviluppa in circa 30' in una soluzione di genius buffer (0,1 M TrisHCl (50 ml di 2M in IL), 0,05 M MgCl₂(50 ml di 1M in IL), 0,1 M NaCl(50 ml di 2M in IL)). La reazione implica lo spostamento di un gruppo fosfato dal BICP all'NBT provocando la formazione di un precipitato insolubile di colore blu che assume la forma di uno spot.

RISULTATI

In totale, 279 pazienti siciliani con CD diagnosticata secondo i criteri di Lennard-Jones e 190 soggetti sani sono stati arruolati in questo studio genetico, Tutti i soggetti arruolati hanno dato il consenso informato allo studio. Le analisi genetiche sono state eseguite utilizzando il sequenziamento genico, le endonucleasi di restrizione ed il reverse dot-blot. Le seguenti variabili cliniche sono state incluse: età, luogo di malattia, comportamento, abitudine al fumo, ricorrenza familiare, l'uso di immunosoppressori, modello il fenotipo della malattia è stato determinato in base alla classificazione di Montreal (15)

I dati clinici dei pazienti CD sono presentati nella tabella 1.

Tab. 1: Caratteristiche Cliniche di 279 pazienti

	N°
Sesso	
Maschi	159
Femmine	120
Età media	29 ±12.2
Abitudine al fumo	
Fumatori	114
ex fumatori	38
Non fumatori	135
Sito della malattia	
Ileo	197
ileocolon	44
colon	36
Pattern	
Infiammatorio	110
Stenosante	125
Fistolizzante	44

I dati demografici le caratteristiche cliniche e genetiche dei pazienti e dei soggetti sani sono stati registrati in una banca dati di Excel

Le frequenze alleliche e genotipiche dei pazienti e dei controlli sono stati confrontati per verificare l'associazione con il test X^2 o il test Fishers esatto ove opportuno. I rischi relativi / odds ratio sono stati calcolati usando metodi standard di regressione logistica ed elaborati utilizzando STATA 9.2 (StataCorp, College Station, Texas). Gli intervalli di confidenza sono stati dati al momento opportuno. Le analisi univariata e multivariata mediante regressione logistica sono stati effettuati per valutare la relazione tra caratteristiche cliniche e il 3 geni. I risultati sono stati espressi come odds ratio (OR) con limiti di confidenza al 95%. Per l'analisi statistica di regressione logistica binaria è stato utilizzato per determinare l'interazione a due a due e tre vie effetto con l'inclusione degli effetti principali di ogni gene nel modello.

le frequenze alleliche di NOD2/CARD15, IL23R e le varianti del gene ATG16L ed i pattern genetici dei pazienti e dei controlli sono riportati nella tabella 2 e nella tabella 3.

Tab. 2: Frequenze alleliche delle varianti NOD2, IL23R and ATG16L

	N°pts	AF %	N°contr	AF %	OR (95%CI)	p-value
NOD2						
Leu1007fin(+)	36/558	6,45	4/380	1,05	6,48 (2.3-18)	<0,00001
Leu1007fin(-)	522/558	93,55	376/380	98,95		
R702W(+)	24/558	4,3	10/380	2,63	1.73 (0.8-3.6)	0,14
R702W(-)	533/558	95,7	370/380	97,37		
G908R(+)	36/558	6,45	6/380	1,58	4,3 (1.8-10)	0,0004
G908R(-)	522/558	93,55	374/380	98,42		
Nod2(+)	96/558	17,2	20/380	5,26	3,7 (2.2-6.1)	<0,00001
Nod2(-)	463/558	82,8	360/380	94,74		
IL23R						
R381Q(+)	15/558	2,69	29/380	7,63	0,32 (0.16-06)	0,0004
R381Q(-)	543/558	97,31	351/380	92,37		
ATG16L						
T300A(+)	322/558	57,71	197/380	51,84	1,26 (0.97-1,6)	0,08
T300A(-)	236/558	42,29	183/380	48,16		

Tab. 3: Pattern genetici dei pazienti e dei controlli

Genotypes	N° pts	N° contr	OR (95%CI)	p-value
Nod2(+/-).R381Q(+/-).T300A(+/-)	2	2	0,68 (0,05-9,45)	1,00
Nod2(+/-).R381Q(+/-).T300A(+/+)	1	1	0,68 (0,008-53,65)	1,00
Nod2(+/-).R381Q(-/-).T300A(+/+)	23	5	3,3 (1,2-11,37)	0,02
Nod2(+/-).R381Q(-/-).T300A(+/-)	21	12	1,2 (0,55-2,77)	0,61
Nod2(+/-).R381Q(+/-).T300A(-/-)	2	0	2,74 (0,27-136,06)	0,65
Nod2(+/+).R381Q(-/-).T300A(+/+)	4	0	5,75 (0,74-248,82)	0,09
Nod2(+/+).R381Q(-/-).T300A(+/-)	10	0	14,6 (2,3-607,9)	0,0004
Nod2(-/-).R381Q(+/-).T300A(+/-)	6	12	0,33 (0,09-0,95)	0,02
Nod2(-/-).R381Q(+/-).T300A(+/+)	3	7	0,29 (0,04-1,26)	0,10
Nod2(+/-).R381Q(-/-).T300A(-/-)	10	0	14,6 (2,3-607,9)	0,0004
Nod2(+/+).R381Q(-/-).T300A(-/-)	4	0	5,75 (0,74-248,82)	0,09
Nod2(-/-).R381Q(+/-).T300A(-/-)	1	7	0,09 (0,002-0,74)	0,01
Nod2(-/-).R381Q(-/-).T300A(+/-)	95	71	0,86 (0,58-1,29)	0,46
Nod2(-/-).R381Q(-/-).T300A(+/+)	63	37	1,21 (0,75- 1,96)	0,42
Nod2(-/-).R381Q(-/-).T300A(-/-)	34	36	0,59 (0,35-1,02)	0,04
Total	279	190		

Le analisi dei polimorfismi di singoli nucleotidi(SNP) in associazione alla malattia di cron mostrano che per il NOD2 La variante G908R (OR 4,3 IC 1,8-10, p <0,01) e la variante L1007f (OR 6,48 IC 2,3-18, p <0.01) erano significativamente associati con CD (Tab2). La variante R702W non è risultata statisticamente associata con Cd (OR 1,73 CI 0,8-3,6, p = 0,14) (Tab2). NOD2 globalmente è stata significativamente associata con CD = o 3.2 (CI 1,9-5,6) (Tabella 4) varianti di NOD2 sono stati associati anche con pattern stenosante, fistolizzante, con la malattia ileale, e con l'età (Tabella 7).

Tab. 4

Main effects	OR (95%CI)	p-value
Model		
NOD2	3.2 (1.9-5.62)	<0.0001
IL23R	0.3 (0.15-0.6)	0.001
ATGL	1.2 (0.7-1,9)	0.36

Tab. 7

Main effects	OR (95% CI)	p-value
One-way models		
Age~NOD2	0.41 (0.2-0.95)	0.04
arthropathies ~IL23R	5.45 (1.7-17.3)	0.004
Ileo~NOD2	6.2 (1.4-27)	0.01
NOD2 stenosing	2.0 (1.1-3.7)	0.02
NOD2 Fistulising	2.6 (1.1-6.1)	0.02

Per IL-23R risulta che i portatori della variante allelica minore R381Q, allele A, avevano un rischio ridotto di sviluppare CD (OR 0,32, CI 0,16-0,60, p <0,01) (Tab. 4). I pazienti con la variante

R381Q hanno avuto più frequentemente artropatie (OR 5,4, IC 1,7-17,3, $p < 0,01$) (Tab. 7).

Per la variante ATG16L1 T300A, un aumento, ma non significativa della frequenza dell'allele dell'allele G è stata osservata nei pazienti con CD (OR 1,26, CI 0.7-1,9; $p = 0,36$) (Tab. 4). Nessuna correlazione genotipo/fenotipo è stata trovata.

Abbiamo valutato l'esistenza di una specifica interazione gene-gene di NOD2, IL-23R e ATG16L1. Abbiamo eseguito l'analisi statistica a due vie di interazione ed a tre vie (Tabella. 5).

Tab. 5 analisi di Interazione

Interaction	OR (95%CI)	p- value
Two-way interaction		
NOD2 x ATG16L	0.16 (0.03-1.01)	0.051
NOD2 x IL23R	0.91 (0.2-4.9)	0.92
IL23R x ATG16L	2.12(0.3-14.5)	0.45
Three-way interaction		
NOD2 x ATG16L x IL23R	0.96 (0.02-66.9)	0.98

risultava una interazione significativa ma moderato NOD2 e ATG16L1. Per tutte le altre combinazioni non vi era alcuna evidenza di interazione statistica oltre al principale effetto di singoli geni, ad indicare che ogni gene contribuisce in modo indipendente per la suscettibilità al CD. Inoltre abbiamo testato in un modello multivariato per l'interazione tra NOD2 e ATG16L1 ed in questo

modello è stata osservata un'interazione negativa, inoltre ATG16L1 era vicino alla significatività ($p = 0.06$) (Tabella 6).

Tab. 6

Gene	O. R.	P	[95% Conf. Interval]
nod2	9.8	0.004	2.1- 45.6
atg16l	1.6	0.061	0.97 - 2.6
nod2_atg	0.2	0.083	.04 - 1.20

DISCUSSIONE

La malattia di Crohn rappresenta un problema sanitario di rilevante interesse, sia per la sua frequenza che per il suo andamento cronico. Si ritiene che almeno in parte la malattia sia figlia del nostro tempo e del nostro stile di vita: le segnalazioni nei secoli passati, infatti, erano molto rare e un aumento di incidenza importante è stato misurato nell'ultimo secolo e nei paesi a maggior sviluppo igienico-economico (Alic M. *et al.*, 2003). Le cause della malattia non sono note anche se è certo che ci sia un ruolo importante giocato da componenti genetiche e ambientali (Amre D.K. & Seidman E.G., 2003). La recente identificazione di alcuni dei geni coinvolti nella suscettibilità alla malattia, tuttavia, non ha ancora permesso di comprenderne le basi eziopatogenetiche e, nonostante gli avanzamenti tecnologici delle terapie biologiche, il trattamento resta basato su un intervento antinfiammatorio aspecifico (Inducing remission in inflammatory bowel disease).

I modelli animali della malattia di Crohn hanno contribuito a comprendere la forma umana solo marginalmente, sottolineando il ruolo patogenetico di citochine pro-flogogene del tipo Th1 e Th17, ma hanno aiutato meno ad identificare gli eventi iniziali da cui l'infiammazione origina. Di fatto oggi rileviamo che, mentre i

modelli animali puntavano la loro attenzione sul funzionamento dei linfociti T regolatori, l'identificazione dei geni associati al rischio nella malattia umana sposta l'attenzione sulle cellule dell'immunità naturale. I primi geni identificati in associazione con la malattia di Crohn (*NOD2*) sono espressi soprattutto nelle cellule della linea monocito-macrofagi-cellule dendritiche (Hugot J.P. *et al.*, 2001; Lamhonwah A.M. *et al.*, 2003; Peltekova V.D. *et al.*, 2004). Il ruolo dei monociti nelle lesioni granulomatose tipiche della malattia di Crohn è d'altra parte ben noto e la presenza di mutazioni genetiche che interferiscono con il funzionamento di queste cellule. Abbiamo preferito condurre lo studio su pazienti, piuttosto che su modelli animali. recentissimi lavori dimostrano che uno dei ruoli del gene *NOD2* potrebbe essere quello di limitare la responsività allo stimolo con LPS. abbiamo iniziato l'analisi genetica per i nuovi geni associati alla malattia di Crohn identificati tramite GWA. Ci sembrava di particolare importanza la variante Arg381Gln di IL23R è significativa di protezione per CD o meglio, volevamo valutare se la mutazioni a carico del gene *diminuisce* il rischio di malattia di Crohn, in modo indipendente dalle mutazioni di *NOD2* e se la conoscenza di queste mutazioni ci potesse aiutare a migliorare la correlazione dei dati immunologici con il genotipo (Lamhonwah A.D., 2003; Peltekova V.D. *et al.*, 2004).

Questo studio mostra in una ampia serie di pazienti che le mutazioni in Sicilia per il gene NOD2 sono associate alla suscettibilità CD, con la malattia ileale e pattern stenotante/fistolizzante (Tab.7), che conferma precedenti dati italiani e che la mutazione di IL-23R è di protezione per CD in accordo con altri studi. Il ruolo della AT16L nella nostra popolazione non è così rilevante come in altre aree geografiche. Solo nel modello multivariato (in cui l'interazione con NOD2 viene analizzata) AT16L1 era vicino ad essere significativo. Una recente meta-analisi di soggetti 30.554 ha indicato una significativa associazione tra polimorfismo T300A di ATG16L1 e rischio CD. Tuttavia nessuna associazione significativa è stata trovata negli asiatici suggerendo un possibile ruolo delle differenze etniche. Questa associazione debole della nostra popolazione può essere dovuta al numero di controlli che era più piccolo dei casi e che può essere responsabile del risultato falso negativo. Uno studio italiano e uno studio spagnolo hanno mostrato un aumento debole ma significativo nella frequenza di SNP per ATG16L1 (OR 1,25 IC 1,08-1,45. 1.3 3 O CI 1,28-138). Gli autori hanno dimostrato che nel 59% dei pazienti con questa mutazione era presente mentre era presente nel 54% dei controlli ha un risultato simile alla nostra popolazione (57 pts%, 51,8% dei controlli), ma ovviamente il

maggior numero di pazienti e controlli in tale studio è stato in grado di dimostrare un'associazione statistica. Nel nostro studio in contrasto con altri in letteratura la correlazione genotipo-fenotipo ATG16L1 era negativa con la possibilità che un sottogruppo di pazienti potrebbe avere un'associazione possibile con questo gene (Tab.5). Nonostante la possibilità di risultati falsi negativi della nostra serie va sottolineato che la forza dell'associazione tra AT16L1 e CD negli studi del Mediterraneo non è impressionante. Inoltre, una stretta interazione negativa significativa importanza è stata trovata tra NOD2 e ATG16L1 in accordo con i dati di Weersma et al. Nella nostra popolazione non abbiamo osservato un aumento del rischio in relazione a un numero crescente di alleli di rischio, ma è importante sottolineare che il numero di pazienti è piccolo in ciascun sottogruppo (Tab. 3).

I pazienti positivi NOD2 (sia eterozigoti ed omozigoti), ma negativi per le altre due mutazioni hanno mostrato un più elevato rischio (OR 14,6 e 5,7 rispettivamente) anche se il numero dei pazienti era basso. Per quanto riguarda la relazione genotipo-fenotipo con gli altri geni è interessante sottolineare che una correlazione è stata trovata tra IL23R e la presenza di manifestazioni extraintestinali (tab7). In altre parole, questa mutazione è associata con la presenza di manifestazioni extraintestinali. Naturalmente l'osservazione deve

essere confermato in una serie più ampia di pazienti, ma è intrigante. In conclusione, nella nostra area geografica, in cui vi è una elevata incidenza di CD, in pazienti con CD i polimorfismi di NOD2 ed IL23R mostrano le principali associazioni genetiche pertinenti, mentre ATG16L1 appare meno rilevante nel conferire rischio genetico di CD in tale popolazione.

Questi dati suggeriscono che in Sicilia i determinanti genetici possono svolgere un ruolo nella l'alta incidenza di CD in confronto con aree vicine. Crediamo anche che i dati genetici siano importanti da confortare eventuali Implicazioni terapeutiche. L'associazione genetica proinfiammatoria e il ruolo di IL-23 propone con forza questa via come un possibile bersaglio terapeutico nelle IBD. La somministrazione di anticorpi Anti-P40, che blocchi entrambi le attività di IL-23 e IL-12, si è dimostrata promettente¹¹⁹ nel trattamento di CD. Il contributo del IL23R nelle IBD è probabile che implichi di più che un semplice guadagno o perdita di funzionalità. Pertanto lo studio delle varianti genetiche di IL23R, e studi in corso di questo percorso potrebbero rivelare nuove opzioni terapeutiche. I futuri studi dovrebbero esaminare i meccanismi del forte effetto di protezione della variante Arg381Gln, che potrebbero essere potenzialmente sfruttati per beneficio clinico

BIBLIOGRAFIA

Cho JH, Weaver CT. The genetic of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2007; 133:1327–1339.

Tremelling M, Kummings F, Fisher SA, et al. IL-23R variations determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2007;132:1657–1664.

Oliver J, Rueda B, Lopez-Nevot MA, et al. Replication of an association between IL23R gene polymorphism with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5: 977–981.

Zouiten-Mekki L, Zaouali H, Boubaker J, et al. CARD15/NOD2 in a Tunisian population with Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 2005;50:130–135.

Cachia E, Calleia N, Aakeroy R, et al. Incidence of inflammatory bowel disease in Malta between 1993 and 2005: a retrospective study. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:550 –553.

Cottone M, Renda MC, Mattaliano A, et al. Incidence of Crohn's disease and CARD15 mutation in a small township in Sicily. *Eur J Epidemiol*. 2006;21:887– 892.

G. Civitavecchia, M.C. Renda, R.F. Ruggeri, A. Maggio, S. Renna, A. Orlando, M. Cottone. IL-23R Determines Susceptibility in Crohn's Disease in a Mediterranean Area. *Inflamm Bowel Dis*. 2008

Johan Van Limbergen, M.D., M.R.C.P.C.H.,^{1,2} Richard K. Russell, M.R.C.P.C.H., Elaine R. Nimmo, B.Sc., M.Sc., Ph.D., and Jack Satsangi, D.Phil., F.R.C.P. The Genetics of Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2820–2831

Dermot McGovern and Fiona Powrie. The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. *Gut* 2007;56:1333-1336

Dunecan Massey and Miles Parkes. Common pathways in Crohn's disease and other inflammatory diseases revealed by genomics *Gut* 2007;56:1489-1492

Hugot J.P. et al: Association of NOD2 leucine rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.

David Q. Shih, MD, PhD, Stephan R. Targan, MD, and Dermot McGovern, MD, PhD, MRCP. Recent Advances in IBD Pathogenesis: Genetics and Immunobiology. *Inflammatory Bowel Disease* 2008, **10**:568–575

Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet.* 2008 Aug;40(8):955-62.

Van der Linde K, Boor P, Jeanine J, Houwing-Duistermaat, Crusius BJA et al. CARD15 mutations in Dutch familial and sporadic inflammatory bowel disease and an overview of European studies *European of Gastroenterology and Hepatology* 2007;19:449-459

Okazaki T, Wang MH, Rawsthorne P, Sargent M, Datta LW, Shugart YY et al. Contribution of IBD5, IL23R, ATG16L1 and NOD2 to Crohn's disease risk in a population-based case-control study evidence of gene-gene interactions. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:1528-1541

Nunez C, Barreiro M, Munoz ED, Lorenzo A, Zapata C, Pena AS et al. CARD15 mutation in patients with Crohn's disease in a homogeneous spanish population *Am J Gastroenterol* 2004;99:450-6

Cottone M, Renda MC, Mattaliano A, Oliva L, Fries W, Criscuoli V et al Incidence of Crohn's disease and CARD15 mutation in a small township in Sicily. *Eur J Epidemiol.* 2006;21(12):887-92.

Zoultan-Mekki, Zaouali H, Boubaker J, Karoui S, Fekith M, Matri S, et al : CARD15/NOD2 in a Tunisian population with Crohn's disease . *Dig Dis Sci* 2005;50:130-5.

Economou M, Philis G, Tsianou Z, Alamanos J, Kogevinas A, Masalas K. Crohn's disease incidence.evolution in North-Western Greece is not associated with alteration of NOD2/CARD15 variants. *World J Gasrtroenterol* 2007;13:5116-20

Ince AT, Hatirnaz O, Ovunc O, Ozbek. 1007fs, G908R,R702W mutations and P268S, IVS8+158 polymorphism of the Card15 gene in Turkish inflammatory bowel disease patients and their relationship with disease related surgery Dig Dis Sci 2008;53:1683-92

Oliver J, Rueda B, Lopez-Nevot MA, Gomez-Garcia M, Martin J Replication of an association between IL23R gene polymorphism with inflammatory bowel disease Clin Gastroenrol Hepatol 2007;5:977-81

Borgiani P, Perricone C, Ciccaci C, Romano S, Novelli G, Biancone L, Petruzzello C, Pallone F. Interleukin 23R Arg381Gln is associated with susceptibility to Crohn's disease but not with phenotype in an Italian population. Gastroenterology 2007;133:1049-1058

Marquez A, Nunez C, Martinez A, Mendoza JL, Taxonera C, Fernandez-Arquero M, Diaz Rubio M, De la Concha EG, Urcelay E. Role of ATG16L1 Thr300Ala Polymorphism in inflammatory bowel disease. A study in the Spanish population and a metanalysis. Infl Bowel Dis 2009 online.

Latiano A, Palmieri O, Valvano MR, D'Inca R, Cucchiara S, Riegler G, Staiano AM, Ardizzone S, Accomando S, De Angelis GL, Corritore G, Bossa F, Annese V. Replication of interleukin 23 receptor and autophagy related 16-like association in adult and pediatric onset inflammatory bowel disease in Italy World J Gastroenterol 2008;08:4643-4651

Lennard-Jones G. Classification of inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol Suppl 1989;179:2-6.

Shivananda S, Lennard-Jones G, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankestein M and the EC-IBD Study group. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe. Is there a difference between north and south? Results of the European collaborative study on inflammatory bowel disease (EC-IBD). Gut 1996;39:690-7.

Annese V, Lombardi G, Perri F, D’Inca R, Ardizzone S, Riegler G et al Variants of CARD15 are associated with an aggressive course of Crohn’s disease. An IG-IBD study American J Gastroenterol 2005; 100:84-92

Bianchi V, Maconi G, Ardizzone S, Colombo E, Ferrara E, Russo A et al. Association of NOD2/CARD15 mutations on Crohn’s disease phenotype in an Italian population. Eur J Gastroenterol and Hepatology 19:217-223

Tremelling M, Cummings F, Fisher SA, Mansfield J, Gwillian R, Keniri A et al.
IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in Inflammatory bowel diseases. Gastroenterology 2007;132:1657-1664

19-Hai-Feng Zhang, Li-Xin Qiu, Yu Chen, Wa-Li Zhu Chen Mao, Li-Guang Zu, Ming-Hua Zheng, Yan Lang Lei Lei, Jian Shi. ATG16L1 T300A polymorphism and Crohn’s disease susceptibility: evidence from 13022 cases and 17,532 controls. Human Genet 2009;125:627-631

Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, Hampe J, Onnie CM, Soars D et al A non synonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn’s disease and is independent of Card15 and IBD5 Gastroenterology 2007;132:1665-71

Veersma RK. Stokkers PCF, Van Bodegraven AA, Van Hogezaand RA, Verspaget HW, DeJong DJ et al Molecular prediction of disease risk and severity in a large Dutch Crohn’s disease cohort. Gut 2009;58:388-395