

Brescia 11.02.2020

Alla Fondazione Camillo Golgi
Via Gramsci 17
25122 Brescia

Relazione del progetto finanziato dalla Fondazione Golgi

Titolo del progetto: Studio del ruolo di varianti genetiche nel gene AHI1 nella patogenesi del difetto selettivo di IgA (SIgAD)

Principal Investigator: Prof. Vassilios Lougaris

Affiliazione: Clinica Pediatrica e Istituto di Medicina Molecolare A. Nocivelli, Dipartimento di Scienze Cliniche e Sperimentali, Università di Brescia e ASST-Spedali Civili di Brescia

Introduzione

Il difetto selettivo di IgA rappresenta una forma di immunodeficienza primitiva umorale. In questa specifica forma di immunodeficienza, il difetto consiste in una selettiva incapacità del sistema immune a produrre IgA. Le IgA rappresentano la immunoglobulina maggiormente presenti nelle secrezioni come la saliva, il latte materno, le lacrime e il muco, secrezioni che ricoprono le varie superfici mucose del nostro organismo. In queste sedi le IgA svolgono la funzione di rivestire, come una vernice asettica, tutte le superfici mucose e nel caso siano assenti si ha un maggior ingresso di batteri e anche di sostanze allergizzanti da qui le infezioni e le malattie allergiche/autoimmuni.

Finora le cause per cui alcuni soggetti non erano in grado di produrre selettivamente le IgA erano rimaste un mistero. Diverse ipotesi erano state formulate nei vari anni ma sempre basate su dati poco convincenti. Questo perché, in assenza della identificazione del difetto genetico, è difficile formulare delle ipotesi valide. Questo mistero è stato in parte risolto da un lavoro multicentrico internazionale, al quale ha partecipato anche il nostro gruppo, e pubblicato sulla prestigiosa rivista medico-scientifica "Nature Genetics". In questo studio, attraverso una fine analisi genetica condotta su 1635 pazienti con deficit selettivo di IgA, sono state identificate delle varianti genetiche a livello dei geni *PVT1*, *AHI1*, *AMBRA1-ATG13* e *CLEC16A*, che si trasmettono con la malattia, e pertanto vi è una elevata probabilità che queste varianti siano coinvolte nello sviluppo del deficit selettivo di IgA. Il nostro centro segue circa 80 pazienti con deficit selettivo di IgA (sia pediatrici che adulti) che risiedono in Brescia e dintorni. Un numero elevato che, anche sulla base dei dati epidemiologici, risulta essere superiore a quello di altre regioni. Basandoci sui risultati della pubblicazione sopracitata, ci siamo proposti di

1. Studiare i meccanismi molecolari attraverso i quali il gene *AHI1* blocca specificatamente la produzione delle IgA.
2. Sviluppare dei modelli di strategie terapeutiche, facendo uso anche di modelli in vitro, che consentano di bypassare il difetto genico con possibile produzione, anche parziale, di IgA.

Dal punto di vista sperimentale, ci eravamo proposti di seguire il seguente schema:

1. Screenare almeno 50 pazienti affetti da difetto selettivo di IgA seguiti presso la nostra Unità per varianti nel gene *AHI1*
2. Allestire dei test funzionali in vitro che possano offrire degli indizi sul ruolo del gene *AHI1* nella produzione di IgA nell'uomo.

Risultati

Sanger sequencing

La prima parte del nostro studio ha riguardato l'arruolamento dei pazienti affetti da difetto di IgA seguiti presso la nostra Unità. Abbiamo incluso 50 pazienti affetti da difetto selettivo di IgA. Il sequenziamento genico diretto mediante Sanger ha messo in evidenza che 5/50 pazienti presentavano questa variante, mentre i rimanenti 45/50 non presentavano la variante rs7773987.

Espressione di RNA messaggero

Per valutare l'effetto diretto della variante rs7773987 in AIH1, abbiamo suddiviso i pazienti con difetto selettivo di IgA in 2 gruppi: quelli con e quelli senza la variante in AIH1. Nei pazienti con la variante si è osservata una ridotta espressione di livelli di RNA messaggero rispetto a quelli senza variante.

Silenziamiento genico

Avendo identificato pertanto un effetto biologico della variante rs7773987 del AIH1 sui livelli di espressione di RNA messaggero, abbiamo valutato se questa ridotta espressione determinasse una ridotta produzione di IgA in soggetti di controllo sani.

Progetti Futuri

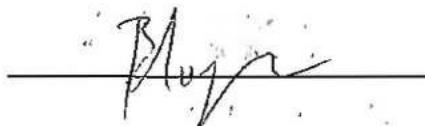
Considerati i risultati ottenuti finora, ci proponiamo di procedere con lo studio di questa variante genica di AIH1 anche in pazienti affetti da altre forme di difetti anticorpali, come la Immunodeficienza Comune Variabile (CVID), per meglio definire il ruolo di questa alterazione genica nella patogenesi dei difetti anticorpali umani.

Conclusioni

Il difetto selettivo di IgA rappresenta una forma di immunodeficienza primitiva umorale caratterizzata da un difetto specifico nella produzione di IgA, con conservata produzione delle altre classi (IgG, IgM, IgE). I pazienti affetti possono presentare un'aumentata suscettibilità alle infezioni, a manifestazioni autoimmuni, ad allergie e alla malattia celiaca. Le basi genetiche di questa condizione rimangono tuttora ampiamente sconosciute. Di recente, il nostro gruppo, all'interno di un lavoro collaborativo internazionale, ha correlato la presenza di varianti genetiche a carico dei geni *PVT1*, *AHI1*, *AMBRA1-ATG13* e *CLEC16A* con il difetto selettivo di IgA.

In questo progetto, abbiamo cercato di approfondire il ruolo specifico della variante rs7773987 di AIH1 nella patogenesi del difetto selettivo di IgA. Nella prima parte dello studio, abbiamo valutato la prevalenza di questa variante nel difetto selettivo di IgA. Per questo scopo, abbiamo analizzato 50 pazienti affetti da difetto di IgA seguiti presso la nostra unità e abbiamo identificato 5 su 50 portatori della variante. Successivamente abbiamo dimostrato che questa variante influenza i livelli di RNA messaggero di AIH1 nelle cellule dei pazienti affetti da difetto di IgA. Per dimostrare ulteriormente che questa variante sia implicata nei meccanismi patogenetici di questa immunodeficienza, abbiamo silenziato il gene AIH1 con i siRNA nei controlli sani e dimostrato che questo silenziamento influisce in modo negativo sulla produzione di IgA, supportando l'ipotesi di un possibile ruolo patogenetico di questa variante nel deficit selettivo di IgA.

Prof. Vassilios Lougaris



Elenco pubblicazioni supportate dal Finanziamento della Fondazione C. Golgi al Prof. V. Lougaris (files in pdf in allegato):

1. **Lougaris V**, Chou J, Beano A, Wallace JG, Baronio M, Gazzurelli L, Lorenzini T, Moratto D, Tabellini G, Parolini S, Seelman M, Stafstrom K, Xu H, Harris C, Geha RS, Plebani A. A monoallelic activating mutation in RAC2 resulting in a combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2019 Jan 14. pii: S0091-6749(19)30011-9. doi: 10.1016/j.jaci.2019.01.001 **Impact factor: 13.014**
2. **Lougaris V**, Baronio M, Moratto D, Tampella G, Gazzurelli L, Facchetti M, Martire B, Cardinale F, Lanzarotto F, Bondioni MP, Villanacci V, Grimbacher B, Plebani A. A novel monoallelic gain of function mutation in p110 δ causing atypical activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome (APDS-1). *Clin Immunol.* 2019 Jan 9;200:31-34. doi: 10.1016/j.clim.2019.01.003. **Impact factor: 4.034**
3. **Lougaris V**, Moratto D, Baronio M, Lorenzini T, Rossi S, Gazzurelli L, Bondioni MP, Plebani A. Early B cell developmental impairment with progressive B cell deficiency in NFKB2 mutated CVID disease without autoimmunity. *Clin Immunol.* 2018 Nov 28. pii: S1521-6616(18)30641-7. doi: 10.1016/j.clim.2018.11.014. **Impact factor: 4.034**
4. **Lougaris V**, Baronio M, Gazzurelli L, Lorenzini T, Fuoti M, Moratto D, Bozzola A, Ricci C, Bondioni MP, Ravelli A, Villanacci V, Plebani A. A de novo monoallelic CTLA-4 deletion causing pediatric onset CVID with recurrent autoimmune cytopenias and severe enteropathy. *Clin Immunol.* 2018 Dec;197:186-188. doi: 10.1016/j.clim.2018.10.007 **Impact factor: 4.034**
5. **Lougaris V**, Lanzi G, Baronio M, Gazzurelli L, Vairo D, Lorenzini T, Badolato R, Notarangelo LD, Boschi A, Moratto D, Plebani A. Progressive severe B cell and NK cell deficiency with T cell senescence in adult CD40L deficiency. *Clin Immunol.* 2018 May;190:11-14. doi: 10.1016/j.clim.2018.02.008 **Impact factor: 4.034**
6. **Lougaris V**, Tabellini G, Baronio M, Patrizi O, Gazzurelli L, Mitsuiki N, Pozzi MR, Grimbacher B, Parolini S, Plebani A. CTLA-4 regulates human Natural Killer cell effector functions. *Clin Immunol.* 2018 Sep;194:43-45. doi: 10.1016/j.clim.2018.06.010. **Impact factor: 4.034**
7. Cicalese MP, Gerosa J, Baronio M, Montin D, Licciardi F, Soresina A, Dellepiane RM, Miano M, Baselli LA, Volpi S, Dufour C, Plebani A, Aiuti A, **Lougaris V**, Fousteri G. Circulating Follicular Helper and Follicular Regulatory T Cells Are Severely Compromised in Human CD40 Deficiency: A Case Report. *Front Immunol.* 2018 Aug 6;9:1761. doi: 10.3389/fimmu.2018.01761. **Impact factor: 6.429**
8. **Lougaris V**, Chou J, Baronio M, Gazzurelli L, Lorenzini T, Soresina A, Moratto D, Badolato R, Seelman M, Bellettato M, Geha RS, Plebani A. Novel biallelic TRNT1 mutations resulting in sideroblastic anemia, combined B and T cell defects, hypogammaglobulinemia, recurrent infections, cardiomyopathy and developmental delay. *Clin Immunol.* 2017 Nov 21. pii: S1521-6616(17)30834-3. doi: 10.1016/j.clim.2017.11.008. **Impact factor: 4.034**