

Università
degli Studi
di Cagliari



INAUGURAZIONE
ANNO ACCADEMICO
2014-2015

Prolusione della *Prof.ssa Maria Giovanna Marrosu*
“Immunità in Sardegna: dono degli dei o mela avvelenata?”

Aula Magna del Rettorato di Cagliari
Martedì 9 Dicembre 2014

Immunità in Sardegna: dono degli dei o mela avvelenata?

Maria Giovanna Marrosu

Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Clinica e Molecolare
Università di Cagliari

1. Struttura genetica della popolazione sarda: il risultato di geni ancestrali e pressione ambientale

La Sardegna è caratterizzata da un background genetico particolare e può essere considerata una “deriva genetica”. Cavalli-Sforza nel 1988 (1), sulla base di dati genetici, archeologici e linguistici, separò la popolazione della Sardegna dalle altre popolazioni europee, come risultato di uno split precoce dagli originari popoli indo-europei. L’attuale struttura genetica dei sardi è derivata da una concomitanza di fattori: fattori genetici, rappresentati oltre che da un pool di geni ancestrali anche da un ristretto numero di fondatori e da selezione genetica sulla base di forti pressioni ambientali; fattori geografici, quali l’insularità che ha favorito uno scarso apporto di materiale genetico proveniente da nuove popolazioni; fattori demografici, quali una popolazione poco numerosa in rapporto al territorio; fattori sociali, quali l’alto grado di endogamia, legato a diritti patrimoniali e a matrimoni all’interno di popolazioni residenti in piccoli isolati. Fra tutti questi, la pressione ambientale è stata uno dei maggiori determinanti della selezione genetica. In questo contesto, gli agenti patogeni ambientali giocano un ruolo fondamentale. Ricordiamo a questo proposito la relazione intercorrente fra la talassemia e la malaria, una condizione endemica per la Sardegna, riportata già da Erodoto, descritta nel 1977 da Antonio Cao e collaboratori (2).

2. Il sistema MHC: fitness in Sardegna e geni della risposta immunitaria

Fra i geni coinvolti nel determinare la struttura di una popolazione, i geni della risposta immunitaria giocano un ruolo determinante. La regione MHC (Major Histocompatibility Complex) o regione HLA (Human Leukocyte Antigen), situata nel braccio corto del cromosoma 6 umano, contiene oltre 200 geni che codificano le molecole fondamentali per il riconoscimento degli antigeni e per l’istruzione della cascata di eventi che conduce alle risposte

del sistema immunitario. I geni della regione MHC sono caratterizzati da un elevato polimorfismo, che si traduce in un'elevata variabilità allelica, ossia in forme diverse di uno medesimo gene. Un'altra caratteristica degli alleli del sistema MHC è rappresentata dal linkage-disequilibrium, fenomeno per il quale alleli di geni diversi, situati in regioni vicine all'interno del sistema HLA, vengono ereditati in blocco in una sequenza detta aplotipo. Gli alleli e gli aplotipi variano sia nella loro frequenza che nella loro combinazione in popolazioni differenti, sulla base dell'origine della popolazioni e delle forze di selezione ambientale. Nel corso dei secoli e in un determinato contesto ambientale, gli individui di una data popolazione sono selezionati in base alla loro risposta immunitaria verso i patogeni, per cui solo coloro che portano varianti di geni del sistema immunitario in grado di rispondere efficacemente ai patogeni sono in grado di sopravvivere e generare ("fitness theory"). Un esempio di pressione selettiva positiva sugli alleli HLA in Sardegna è l'alta frequenza dell'allele HLA-B35 in individui residenti in località soggette nel passato ad endemia malarica (3). La peculiarità delle varianti alleliche e aplotipiche del sistema HLA della popolazione sarda risultano in gran parte da effetti di selezione sulla base di pressione ambientale. Ad esempio, la frequenza dell'allele DR3 (aplotipo HLA-DRB1*0301-DQB1*0501) è fra le più elevate al mondo (4.) Si ipotizza che la selezione di questo aplotipo abbia seguito la diffusione dell'espansione dell'agricoltura dalle regioni dell'antica Mesopotamia (detta in seguito Mezzaluna Fertile), circa 10.000 anni orsono, fino alla Sardegna, meno di 4.500 anni fa. L'aplotipo DR3 mostra un gradiente inverso alle ondate migratorie dell'uomo raccoglitore, per cui più antica è stata la diffusione cerealicola, minore è la frequenza di DR3. Il gradiente inverso sarebbe spiegato con la selezione negativa esercitata sui portatori di questo aplotipo dalla celiachia, malattia autoimmune associata al DR3 e determinata dall'ingestione di glutine: in assenza di alimentazione priva di glutine, il genotipo DR3 legato alla celiachia avrebbe esercitato un impatto negativo sulla sopravvivenza e sulla capacità riproduttiva per migliaia di anni (5), determinando la sua bassa frequenza nelle regioni a più antica attività agricola. Altro esempio è rappresentato dall' aplotipo DR4 (DRB1*0405-DQB1*0501), che costituisce una variante squisitamente sarda, verosimilmente dovuta in origine ad un evento stocastico di ricombinazione ma mantenuta nel tempo perché utile alla fitness della popolazione (6). Al

contrario, altri alplotipi, quali il DR2, sono virtualmente assenti nella popolazione sarda (7). Nel complesso, varianti alleliche del sistema HLA sono un ottimo indicatore della distanza genetica fra la popolazione della Sardegna e altre popolazioni europee, Italia compresa (8).

Questo peculiare assetto delle varianti alleliche del sistema HLA nella popolazione sarda, risultato da forze di pressione selettiva agenti nei secoli, ha prodotto individui con capacità di risposte immunitarie efficaci nei confronti di patogeni presenti stabilmente nell'Isola, risposte indispensabili alla sopravvivenza degli abitanti, particolarmente in epoche pre-antibiotiche. Indubbiamente, alla grande capacità di risposte pro-infiammatoria della nostra popolazione possiamo almeno in gran parte ascrivere l'elevato numero di centenari in buona salute che caratterizza la Sardegna, in un felice equilibrio fra geni e ambiente.

3. Ruolo dell'ambiente: i cambiamenti ambientali inducono l'autoimmunità.

Dopo la seconda Guerra Mondiale le condizioni ambientali della Sardegna sono tumultuosamente cambiate, in relazione al miglioramento delle condizioni igieniche e sanitarie, quali uso di antibiotici e di vaccinazioni, eradicazione di malattie endemiche quali malaria, tubercolosi, brucellosi; a variazioni sociali, quali drastica diminuzione del numero dei nuovi nati, elevato utilizzo di farmaci anticoncezionali, diffusione del fumo di sigaretta nelle donne; a cambiamenti nell'economia, quali passaggio da attività prevalentemente agro-pastorali all'industrializzazione con conseguente incremento dell'inquinamento, massificazione del turismo. L'impatto improvviso di questi e altri cambiamenti ha agito su una popolazione il cui assetto genetico si era modellato nel corso di centinaia di anni sulla base di differenti e consolidati fattori ambientali. Poiché la struttura genetica di una popolazione richiede vari secoli per riadattarsi all'ambiente ("gene-environment evolutionary time mismatch"), in questo nuovo contesto geni che sono stati neutri o benefici per centinaia di anni possono diventare sfavorevoli. L'"ipotesi igienica" correla la diminuzione di malattie infettive con l'aumento di malattie autoimmuni e allergiche, un fenomeno osservato nel corso degli ultimi 50 anni in tutto il mondo occidentale (9). Di fatto, la Sardegna presenta un'elevata incidenza e prevalenza di malattie autoimmuni (10); in particolare, la frequenza di sclerosi multipla (11) e

diabete tipo 1 (12) sono fra le più alte al mondo. Non soltanto, ma la frequenza di diabete tipo 1 è molto più elevata in persone con sclerosi multipla rispetto alla popolazione generale (13), dimostrando una straordinaria co-segregazione di malattie autoimmuni nella nostra popolazione. Tuttavia, il legame fra malattie autoimmuni e ambiente è molto più complesso e presenta apparenti paradossi. Fra i fattori ambientali determinanti il rischio di sclerosi multipla, un ruolo ormai assodato è dato dall'infezione da virus di Epstein-Barr (14), come pure in Sardegna un fattore di rischio è costituito dal *Mycobacterium Avium subspecies Paratuberculosis*, presente endemicamente nei bovini sardi e diffuso nell'ambiente tramite il latte di animali infetti (15). Ugualmente, la carenza di vitamina D è un determinante del rischio sia di sclerosi multipla (16) che di diabete tipo 1 (17). Le fonti principali di vitamina D negli umani sono rappresentate dalla dieta e dall'irradiazione solare: nonostante la Sardegna goda di una condizione privilegiata sotto quest'ultimo aspetto, il rischio di sclerosi multipla e di diabete tipo 1 nella nostra popolazione è paragonabile a quello di regioni nord-europee a bassa insolazione, quali Svezia e Finlandia, paradosso non spiegato tuttavia dalla struttura genetica della popolazione sarda (18).

4. Ruolo dei geni: alleli HLA e suscettibilità alla sclerosi multipla in Sardegna

Come molte malattie a "tratto complesso", le malattie autoimmuni hanno la loro base nella interconnessione fra geni e ambiente. La componente genetica della sclerosi multipla è dovuta ad oltre cento varianti geniche, con un ruolo preminente degli alleli del sistema HLA (19). Diversamente dalle popolazioni nord-europee e di origine nord-europea, nelle quali la sclerosi multipla è associata all'aplotipo DR2 (19) praticamente assente in Sardegna (7), nella nostra popolazione la malattia è associata al DR4 (20) e al DR3 (21), entrambi gli alleli nella combinazione formante le particolari varianti degli aplotipi "sardi" (22). Ugualmente, anche il diabete tipo 1 è associato al DR3 e ad un aplotipo DR4 (DRB1*0405-DQB1*0302) (23). Può dunque essere ipotizzato che proprio varianti alleliche HLA squisitamente "sarde", e perciò selezionate nei secoli sulla base della fitness che essi conferivano alla popolazione, siano diventate predisponenti a malattie autoimmuni. Questa ipotesi è suggerita da dati epidemiologici e genetici: suddividendo pazienti

sardi affetti da sclerosi multipla in coorti basate sugli anni di nascita, si osserva una frequenza più elevata di alplotipi HLA predisponenti alla malattia nella coorte di pazienti più recente e con età all'esordio più giovane (24). Si può ritenere che su una popolazione dotata di un background arricchito di varianti di geni immunitari capaci di montare risposte pro-infiammatorie rapide ed efficaci in risposta a patogeni ambientali, nuovi fattori ambientali favoriscano una frequenza maggiore e un esordio più precoce della patologia.

5. Epigenetica: una relazione complessa fra geni e ambiente.

Come detto sopra, l'ambiente modella la struttura di una popolazione, ma non soltanto: l'ambiente agisce sui geni anche attraverso meccanismi epigenetici, regolanti e modulanti la trascrizione dei geni mediante segnali ambientali. La trascrizione può essere mantenuta anche in assenza del segnale che l'ha causata e l'effetto può essere perpetuato anche per molte generazioni di cellule e può estendersi anche a cellule pienamente differenziate (25). Per esempio, un verme, *Caenorhabditis elegans*, esposto ad un virus può dare origine a diverse generazioni di individui resistenti a questo virus (26). Si ritiene che anche nella patogenesi della sclerosi multipla l'ambiente promuova o reprima l'attivazione di diversi geni, in particolare quelli della risposta immunitaria, attraverso meccanismi epigenetici, quali dieta, folati, vitamina D, fumo e altri (27). Indicazioni indirette di effetti epigenetici promossi da nuovi fattori ambientali derivano da diversi studi effettuati sulla sclerosi multipla in Sardegna. Risalendo fino al 1600 circa è stato possibile ricostruire il pedigree di tutti i malati di un paese e ricondurre l'origine di tutti i pazienti a due famiglie ("effetto fondatore"); tuttavia, con l'eccezione di un caso, nelle precedenti generazioni la malattia era assente, mentre compariva nella penultima generazione (circa 40 anni fa), suggerendo una forte influenza attuale di fattori ambientali agenti su un background genetico di predisposizione (28). Effetti epigenetici legati a modifiche ambientali degli ultimi 50 anni sono suggeriti anche dall'anticipazione dell'età all'esordio della sclerosi multipla, in media di 5 anni per ogni decennio considerato (29) e dal forte aumento di incidenza che da 0.34/100.000 nel periodo 1958-1967 sale gradualmente fino a 8.07/100.000 nell'epoca 1998-2007 (11). Sempre in Sardegna, uno studio su familiari di persone con sclerosi multipla ha mostrato che

un'elevata percentuale di fratelli sani presentava alla risonanza magnetica le alterazioni tipiche della malattia, suggerendo un impatto dell'ambiente sui meccanismi cellulari modulanti l'espressione di geni "permissivi" al viraggio da segni subclinici all'espressione clinica completa di malattia (30).

6. La ricerca

Racconta il mito che Pandora, trasgredendo all'ordine di Zeus, aprì il vaso che egli le aveva donato, liberando tutti i mali, che si abbattono sull'umanità e resero la terra un luogo desolato. Gli dei infine ebbero pietà delle condizioni degli uomini e consentirono a Pandora di liberare dal vaso la speranza, rimasta imprigionata nel fondo, e così il mondo riprese a vivere. In questo scenario, dove la Sardegna ha un triste primato di malattie autoimmuni, ultima rimane la speranza che la ricerca scientifica spieghi non solo le cause di tali malattie, ma scopra anche le terapie più adeguate. Ed è proprio grazie alla ricerca che oggi disponiamo di un importante armamentario di farmaci per la sclerosi multipla: attualmente le persone ammalate possono ragionevolmente aspettarsi una vita non funestata dalla disabilità. Non è ininfluente sottolineare che tutti i farmaci disponibili e altri in fase di sperimentazione clinica agiscono sul sistema immunitario, ancora una volta sottolineando le basi immunopatologiche della malattia.

La speranza necessita, per essere concretizzata nella ricerca, delle intelligenze e dell'impegno di donne e uomini. L'Università, sede di insegnamento e di ricerca per eccellenza, ha un ruolo fondamentale nel preparare i giovani ricercatori e ha il dovere di promuovere condizioni idonee per il loro operare. Anche nelle attuali contingenze di crisi economica, particolarmente grave in Sardegna, bisogna tenere bene a mente che impegnare risorse economiche e umane nella ricerca scientifica significa investire nel futuro delle nuove generazioni, un dovere ineludibile per un Paese che voglia progredire socialmente e culturalmente.

Bibliografia

1. Cavalli-Sforza LL, Piazza A, Menozzi P et al. Reconstruction of human evolution: bringing together genetic, archaeological, and linguistic data. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:6002-6006
2. Cao A, Melis MA, Galanello R. Fetal haemoglobin and malaria. *Lancet*. 1977;1:202.
3. Contu L, Carcassi C, Orrù S et al. HLA-B35 frequency variations correlate with malaria infection in Sardinia. *Tissue Antigens*. 1998;52:452-61
4. Carcassi C, Porcella R, Manca ML et al. The absence of 21-OH A and C4 B genes is a constant characteristic of the "Sardinian" HLA extended haplotype A30 Cw5 B18 BfF1 DR3 DRw52 DQw2. *Tissue Antigens*. 1989; 34:85-89
5. Lionetti E, Catassi C. Co-localization of gluten consumption and HLA-DQ2 and -DQ8 genotypes, a clue to the history of celiac disease. *Dig Liver Dis*. 2014; 46:1057-1063
6. Vacca A, Carcassi C, La Nasa G et al. Identification of two different HLA B49 DR4 extended haplotypes in the Sardinian population. *Tissue Antigens*. 1994;43:65-70.
7. Cocco E, Murru R, Costa G et al. Interaction between HLA-DRB1-DQB1 haplotypes in Sardinian multiple sclerosis population. *PLoS One*. 2013;8: e59790. doi: 10.1371.
8. Lampis R, Morelli L, De Virgiliis S et al. The distribution of HLA class II haplotypes reveals that the Sardinian population is genetically differentiated from the other Caucasian populations. *Tissue Antigens*. 2000; 7:4167-4168.
9. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*. 2002;347:911-920.
10. Sardu C, Cocco E, Mereu A, et al. Population based study of 12 autoimmune diseases in Sardinia, Italy: prevalence and comorbidity. *PLoS One*. 2012;7:e32487. doi: 10.1371
11. Cocco E, Sardu C, Massa R et al. Epidemiology of multiple sclerosis in south-western Sardinia. *Mult Scler*. 2011;17:1282-1289.
12. Muntoni S, Songini M. High incidence rate of IDDM in Sardinia. Sardinian Collaborative Group for Epidemiology of IDDM. *Diabetes Care*. 1992;15:1317-1322.
13. Marrosu MG, Cocco E, Lai M et al. Patients with multiple sclerosis and risk of type 1 diabetes mellitus
14. in Sardinia, Italy: a cohort study. *Lancet*. 2002;359:1461-1465
15. Levin L, Munger KL, O'Reilly EJ et al. Primary Infection with the Epstein-Barr Virus and Risk of Multiple Sclerosis. *Ann Neurol*. 2010;67: 824-830
16. Frau J, Cossu D, Coghe G et al. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and multiple sclerosis in Sardinian patients: epidemiology and clinical features. *Mult Scler*. 2013; 19:1437-1442.
17. Cantorna MT. Vitamin D and multiple sclerosis: an update. *Nutr Rev*. 2008; 66: S135-S138

18. Hyppönen E, Läärä E, Reunanen A et al. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet*. 2001; 358:1500-1503
19. Cocco E, Meloni A, Murru MR et al. Vitamin D responsive elements within the HLA-DRB1 promoter region in Sardinian multiple sclerosis associated alleles. *PLoSOne*. 2012;7: e41678. doi: 10.1371.
20. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011; 476:214-219
21. Marrosu MG, Muntoni F, Murru MR et al. Sardinian multiple sclerosis is associated with HLA-DR4: a serologic and molecular analysis. *Neurology*. 1988;38:1749-1753
22. Marrosu MG, Murru MR, Costa G et al. Multiple sclerosis in Sardinia is associated and in linkage disequilibrium with HLA-DR3 and -DR4 alleles. *Am J Hum Genet*. 1997;61:454-457.
23. Marrosu MG, Murru MR, Costa G et al. DRB1-DQA1-DQB1 loci and multiple sclerosis predisposition in the Sardinian population. *Hum Mol Genet*. 1998 ;7:1235-1237.
24. Zavattari P, Lampis R, Mulargia A et al. Confirmation of the DRB1-DQB1 loci as the major component of IDDM1 in the isolated founder population of Sardinia. *Hum Mol Genet*. 2000; 9:2967-2972
25. Cocco E, Sardu C, Murru R et al. Multiple sclerosis risk: interaction between human leukocyte antigen and the environment in Sardinian population. *Mult Scler*. 2009; 15:1030-1036.
26. Ptashne M, Faddis. Epigenetics and the inheritance of acquired characteristics *FASEB J*. 2013; 27:1-2
27. Rechavi O., Minevich G., Hobert O. Transgenerational inheritance of an acquired small RNA-based antiviral response in *C. elegans*. *Cell*. 2011. 147, 1248–1256
28. Huynh JL, Casaccia P. Epigenetic mechanisms in multiple sclerosis: implications for pathogenesis and treatment. *Lancet Neurol*. 2013; 12:195-206
29. Marrosu MG, Lai M, Cocco E et al. Genetic factors and the founder effect explain familial MS in Sardinia. *Neurology*. 2002; 58: 283-288
30. Cocco E, Sardu C, Lai M et al. Anticipation of age at onset in multiple sclerosis: a Sardinian cohort study. *Neurology*. 2004;62:1794-1798
31. De Stefano N, Cocco E, Lai M, et al. Imaging brain damage in first-degree relatives of sporadic and familial multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2006;59:634-639