

**Università degli Studi
del
Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”**

**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare
(XIX ciclo)**

Relazione 3° anno

**“POLIMORFISMI DEL GENE DI XIAP
ASSOCIANO CON LE SINDROMI DA FEBBRI
RICORRENTI ED INFLUENZANO I LIVELLI
DI ESPRESSIONE DELLA PROTEINA”**

Massimo Ferretti

Responsabile del progetto:
Prof. Umberto Dianzani

INTRODUZIONE I

La risposta immunitaria[1].

La risposta immunitaria specifica coinvolge linfociti B e T attivati dal riconoscimento di antigeni estranei non-self. I linfociti B riconoscono la maggior parte delle molecole solubili nella loro forma nativa, mentre i linfociti T riconoscono frammenti peptidici processati e presentati dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) espresso sulla superficie di cellule presentanti l'antigene (APC), quali macrofagi, cellule dendritiche e linfociti B. Il riconoscimento dello specifico epitopo antigenico verso cui è reattivo un linfocita, tuttavia, non è sufficiente ad attivare il linfocita verso di esso, ma è necessario un secondo segnale derivato da molecole costimolatorie. La sola stimolazione dovuta al primo dei due segnali induce energia cellulare o apoptosi e la tolleranza periferica verso gli antigeni self. Il secondo segnale è trasmesso ai linfociti T dalle cellule APC tramite segnali infiammatori e ai linfociti B da linfociti T attivati che riconoscono l'antigene presentato dalle cellule B stesse. Questo sistema fa sì che la risposta immunitaria specifica sia attivata esclusivamente in un contesto infiammatorio, il che riduce la possibilità dello sviluppo di aggressioni contro il self.

L'attivazione linfocitaria è accompagnata da modifiche di espressione di molti geni che codificano per molecole di superficie coinvolte nella proliferazione e nelle funzioni effettrici dei linfociti, che garantiscono l'espansione clonale dei linfociti antigene-specifici e la loro differenziazione in cellule effettrici (plasmacellule, linfociti T citotossici, ecc.). Ruolo importante dell'attivazione è anche lo stimolo all'espressione di molte molecole coinvolte in seguito nello spegnimento della risposta immunitaria. Tale evento si verifica tramite l'induzione di apoptosi di gran parte delle cellule effettrici, ma mantenendo un piccolo pool di cellule memoria, a garantire una più veloce ed efficace risposta nel caso in cui venga nuovamente incontrato lo stesso antigene.

Il ruolo dello spegnimento della risposta immunitaria è cruciale per controllare l'espansione del corredo linfocitario periferico, che rimane pressoché invariato grazie all'eliminazione delle cellule effettrici e alla diminuzione del corredo di cellule linfocitarie *naive* compensata dalla moderata espansione delle cellule memoria. Questo sistema di controllo garantisce che non vi sia un accumulo di cloni linfocitari negli organi linfoidi

secondari e che tale accumulo funzioni da fattore promuovente lo sviluppo di reazioni autoimmuni e di neoplasie linfocitarie.

E' inoltre noto come il processo di spegnimento della risposta immunitaria risulta cruciale per ridurre il rischio di autoimmunità derivate dalla cross-reattività tra alcuni antigeni non- self e self. Il modello del mimetismo molecolare assume infatti che la cross-reattività giochi un ruolo fondamentale nelle malattie autoimmuni ed è basato sul fatto che molte proteine di origine virali possiedono al loro interno sequenze peptidiche molto simili a quelle delle proteine self. Tale modello assume quindi che, una volta eliminato l'agente estraneo, il sistema immunitario possa continuare ad agire contro le molecole self cross-reattive e indurre malattie autoimmuni, evitando il controllo sopra descritto. La capacità di poter spegnere la risposta immunitaria è quindi importante per diminuire il rischio di sviluppare autoimmunità.

Nel sistema immunitario, l'apoptosi è il meccanismo principale con cui i linfociti in maturazione negli organi linfoidei primari vengono sottoposti alla selezione negativa per eliminare cellule potenzialmente autoreattive. L'induzione di apoptosi è anche il meccanismo preferenziale che viene attivato dalle cellule citotossiche contro le cellule bersaglio. La fisiologia dell'apoptosi prevede l'autodigestione controllata della cellula che innesca la propria morte programmata attivando una cascata di proteasi endogene. Questo porta al rimaneggiamento del citoscheletro, vescicolazione della membrana, condensazione e frammentazione degli acidi nucleici ed espressione di molecole bersaglio per i macrofagi tissutali. Prima di essere fagocitate inoltre le cellule apoptotiche si scindono in vescicole, chiamate corpi apoptotici, mantenendo l'integrità della membrana plasmatica evitando la dispersione del contenuto citoplasmatico.

Autoimmunità.

Eziologia e patogenesi delle malattie autoimmuni

Agli inizi del '900 Paul Ehrlich propose che il sistema immunitario poteva reagire in modo errato dirigendo il proprio attacco contro antigeni autologhi (*self*) invece che contro antigeni estranei e producesse danni tissutali.

Oggi sappiamo che i sistemi di tolleranza al *self*, che normalmente proteggono ciascun individuo dai linfociti potenzialmente autoreattivi, possono in certi casi fallire.

Questi fallimenti portano allo sviluppo di una risposta inappropriata del sistema immunitario contro tessuti *self*, fenomeno detto **autoimmunità**.

Negli anni '60 si riteneva che tutti i linfociti autoreattivi fossero eliminati durante la maturazione linfocitaria e che le malattie autoimmuni fossero l'inevitabile conseguenza di errori nel processo di delezione delle cellule autoreattive negli organi linfatici primari.

A partire dalla fine degli anni '70 sono state ottenute numerose evidenze sperimentali in contrasto con questo modello. Infatti, linfociti autoreattivi maturi circolanti sono normalmente presenti nei soggetti sani normali.

Poiché la presenza di queste cellule non porta inevitabilmente allo sviluppo di manifestazioni autoimmuni, la loro attività deve essere regolata attraverso meccanismi tollerogenici attivi in periferia. L'alterazione di questi meccanismi può portare all'attivazione di cloni di linfociti autoreattivi e al conseguente sviluppo di reazioni umorali o cellulari contro antigeni *self*.

In molti casi i fattori scatenanti che determinano il passaggio da una potenziale autoreattività alla malattia autoimmune sono gli agenti infettivi, spesso di tipo virale.

Le infezioni possono scatenare la malattia attraverso vari meccanismi:

- 1) La presenza negli agenti infettivi di antigeni simili ad antigeni *self* (fenomeno del "mimetismo molecolare"), come già accennato prima, può determinare una "cross-reazione" contro il *self* da parte della risposta anti-agente infettivo dopo che quest'ultimo è stato eliminato.
- 2) L'infezione può danneggiare i tessuti causando la liberazione di antigeni normalmente sequestrati, che non sono mai venuti in contatto con il sistema immunitario e che sono quindi erroneamente riconosciuti come non *self*.
- 3) Infine il processo infiammatorio cronico locale innescato dall'infezione nel tessuto, determina produzione di citochine e l'attivazione delle APC aumentandone la capacità di presentare gli antigeni e le capacità costimolatorie; la presenza di questo ambiente iper-reattivo potrà permettere l'attivazione di linfociti T autoreattivi che non si sarebbero mai attivati in un contesto immunologicamente a riposo.

I meccanismi appena descritti non sono mutualmente esclusivi, ma intervengono insieme, e probabilmente ciò determina il fenomeno conosciuto come *epitope spreading*, molto frequente nelle malattie autoimmuni. Infatti nel corso della malattia, si passa da una fase iniziale, dove la risposta immune è diretta verso un singolo epitopo di una proteina

self, ad una risposta autoimmune più vasta indirizzata sia verso epitopi diversi della stessa proteina sia verso proteine diverse (espansione epitopica).

Le malattie autoimmuni possono essere divise in due grandi categorie: quelle organo-specifiche e quelle sistemiche.

Nelle malattie autoimmuni organo-specifiche, la risposta immunitaria è diretta contro un antigene bersaglio espresso selettivamente da un certo organo, per cui le manifestazioni della malattia sono in gran parte limitate ad esso. Nelle malattie autoimmuni sistemiche la risposta è diretta contro antigeni bersaglio espressi ubiquitariamente in numerosi tessuti e coinvolge quindi più organi e tessuti.

Dal punto di vista del meccanismo immunopatogenetico, le malattie autoimmuni possono essere mediate da anticorpi oppure da cellule.

Le prime comprendono malattie come le emocitopenie autoimmuni, causate da autoanticorpi contro vari tipi di cellule del sangue, oppure il lupus eritematoso sistemico, causato dalla deposizione in vari tessuti di immunocomplessi formati principalmente da anticorpi contro complessi DNA-istoni o RNA-ribonucleoproteine e i rispettivi autoantigeni. Fanno parte di questa categoria anche alcune malattie autoimmuni organo-specifiche causate da autoanticorpi capaci di esercitare un'attività agonista o antagonista sull'organo bersaglio; ad esempio nel morbo di Graves-Basedow anticorpi anti-recettore del TSH causano iperfunzione tiroidea, mentre nella miastenia grave anticorpi contro il recettore dell'acetilcolina inibiscono la trasmissione dell'impulso neuromuscolare.

Le malattie autoimmuni cellulo-mediate sono una categoria in continua crescita e sono mediate principalmente da linfociti T helper di tipo 1 (Th1), caratterizzati dalla produzione delle citochine proinfiammatorie IL-2, IFN γ e Linfotossina, e da linfociti T citotossici (Tc). Esempi di questo tipo di malattie autoimmuni sono il diabete mellito di tipo 1 oppure la sclerosi multipla in cui i linfociti Th1 e Tc aggrediscono rispettivamente le cellule β del pancreas e la mielina del sistema nervoso centrale. In queste malattie si osserva spesso anche la produzione di autoanticorpi, che sono considerati utili marcatori dello sviluppo della malattia, ma questi sarebbero conseguenza del fenomeno dell'*epitope spreading* e avrebbero un modesto ruolo patogenetico.

Predisposizione genetica

Molte malattie autoimmuni presentano un certo grado di familiarità. Questo ha indotto lo svolgimento di una enorme mole di studi volti a definire i fattori genetici

coinvolti nel loro sviluppo. Nel loro complesso i dati ottenuti disegnano il quadro tipico delle malattie multifattoriali in cui un insieme di geni diversi possono influire nella suscettibilità genetica allo sviluppo della malattia, che richiede comunque l'induzione da parte di fattori scatenanti.

Molti studi genetici hanno evidenziato l'associazione statistica di malattie autoimmuni con particolari polimorfismi di specifici geni, ovvero è stato dimostrato che una certa malattia autoimmune è più frequente nei portatori di un determinato allele di un certo gene. Tuttavia spesso non è chiaro se questi geni siano coinvolti direttamente nello sviluppo della malattia oppure se l'associazione statistica sia legata a fenomeni di *linkage disequilibrium*, ovvero al fatto che un allele si associa frequentemente ad un particolare allele di un altro gene non noto, posto per lo più in vicinanza al primo e coinvolto nella genesi della malattia.

Nel complesso, i fattori genetici che sono stati associati con maggiore certezza all'autoimmunità e la cui base biologica sia stata dimostrata in modo soddisfacente sono il sesso e l'aplotipo HLA. A questi si sono più recentemente affiancati fattori genetici in grado di controllare lo spegnimento della risposta immunitaria.

Associazione col sesso

Numerose malattie autoimmuni hanno una diversa frequenza nel sesso femminile e in quello maschile. Molte di esse, come il lupus eritematoso sistemico, la miastenia grave, la sclerosi multipla e la sindrome di Sjögren, sono molto più frequenti nelle femmine piuttosto che nei maschi. Viceversa la spondilite anchilosante è più frequente nei maschi.

I motivi di questa diversa suscettibilità non sono noti con certezza, ma è probabile che un ruolo centrale sia giocato dagli ormoni sessuali. Non è chiaro se gli ormoni sessuali steroidei abbiano un'azione diretta sui linfociti, tuttavia questa possibilità è suggerita dal fatto che altri steroidi, come il cortisone, hanno un effetto molto potente. Inoltre altri ormoni espressi diversamente nel maschio e nella femmina, come la prolattina, hanno effetto sui linfociti, come dimostrato dal fatto che il recettore per la prolattina è espresso dai linfociti sia T sia B e che la loro risposta a stimoli di attivazione è modulata in vitro da questo ormone.

E' noto che gli ormoni sessuali modulano notevolmente la risposta immunitaria durante la gravidanza indirizzando prevalentemente la risposta immune verso risposte di tipo Th2. Questo presenta due vantaggi: 1) favorisce le risposte anticorpali di tipo IgG, che

sono protettive per il feto dal momento che le IgG superano la barriera placentare; 2) riduce le risposte cellulo-mediate che potrebbero invece aggredire la placenta, che è un organo non self. In effetti alcune forme di aborto precoce ricorrente sono state attribuite ad una eccessiva risposta Th1 o CTL contro la placenta.

In linea con queste osservazioni la gravidanza esacerba alcune malattie autoimmuni mediate da anticorpi (e quindi favorite dai Th2), come il lupus eritematoso sistemico, mentre attenua malattie autoimmuni mediate da cellule infiammatorie (e quindi Th1), come la sclerosi multipla e l'artrite reumatoide. E' quindi possibile che la diversa reattività immunitaria condizionata dai diversi livelli di ormoni sessuali possa essere un fattore in grado di influenzare l'innescò e l'evoluzione della risposta autoimmune nei maschi e nelle femmine.

Associazione con l'aplotipo HLA

Il più noto fattore genetico di predisposizione alle malattie autoimmuni è l'aplotipo HLA. Infatti, per la maggior parte di queste malattie è stata descritta l'associazione con determinati alleli HLA. L'associazione è in genere con alleli di molecole HLA di classe II, anche se in alcuni casi è stata descritta l'associazione con molecole di classe I.

Ad esempio, il rischio di sviluppo di diabete mellito insulino-dipendente è circa 20 volte maggiore in soggetti che esprimono HLA-DR3 e DR4, rispetto a soggetti che esprimono altri alleli; la probabilità di sviluppare sclerosi multipla è 5 volte maggiore nei portatori di DR2; quella di sviluppare miastenia grave è 5 volte maggiore nei portatori di DR3. L'associazione più stretta è però stata osservata nella spondilite anchilosante, il cui rischio di sviluppo è 90 volte superiore in soggetti portatori della molecola di classe I HLA-B27.

In molti casi è stato dimostrato che questa associazione può essere dovuta all'efficienza con cui le molecole predisponenti "presentano" i peptidi self responsabili di quella malattia autoimmune. E' intuitivo infatti che gli individui che esprimono molecole HLA capaci di presentare efficientemente i peptidi self verso cui si sviluppa una certa risposta autoimmune siano più predisposti allo sviluppo della malattia rispetto a soggetti che esprimono molecole MHC poco efficienti nella presentazione degli stessi.

Autoimmunità e Fas [2-11].

Un fattore genetico ereditario che è stato chiamato in causa come responsabile nello sviluppo di sindromi autoimmuni è il difetto funzionale del sistema Fas. Fas è un recettore di membrana in grado di predisporre la cellula verso la sua morte cellulare programmata, ed è espresso da linfociti attivati, risultando quindi importante nello spegnimento della risposta immunitaria e nella deplezione delle cellule effettrici che vengono espanse durante la risposta immunitaria. Una mancata o ridotta funzionalità del sistema apoptotico Fas mediato, risulta quindi essere importante nello sviluppo di malattie autoimmuni.

L'associazione tra il sistema Fas e l'autoimmunità è stata per la prima volta osservata in topi omozigoti per i caratteri *lpr* (lymphoproliferation) e *gld* (generalized lymphoproliferative disease) portatori rispettivamente di mutazioni nel gene di Fas e FasL, i quali sviluppano un quadro autoimmune/linfoproliferativo con linfadenopatia, splenomegalia e autoimmunità a carattere sistemico, prevalentemente rivolte verso cellule del sangue. In più essi evidenziano una periferica espansione di cellule linfocitarie che mancano dei marcatori CD4 e CD8, che permettono di identificare rispettivamente le popolazioni T helper e T citotossiche, e definite per questo cellule doppie negative (DN).

L'associazione di questi caratteri con un mancato funzionamento del sistema Fas è stato successivamente confermato dallo sviluppo di sintomi simili manifestati da topi knock-out per il gene codificante per Fas.

Negli esseri umani, un simile quadro sintomatico è osservabile in pazienti affetti da ALPS (sindrome autoimmune linfoproliferativa), precedentemente conosciuta come Sindrome di Canale-Smith. ALPS è una malattia con insorgenza pediatrica i cui sintomi diagnostici sono riconducibili a: A) massicce reazioni autoimmuni prevalentemente rivolte verso cellule del sangue come anemie emolitiche, piastrinopenie, neutropenie o trombocitopenie, B) accumulo policlonale di linfociti B e T che sono causa di linfadenopatia e splenomegalia a carattere non-neoplastico e C) espansione periferica di linfociti T DN.

Dal punto di vista molecolare l'ALPS può essere diagnosticato dalla marcata resistenza dei linfociti del paziente allo stimolo apoptotico indotto dal sistema Fas.

Il sistema Fas [12-14].

Il recettore Fas (Apo1/CD95) è una glicoproteina transmembrana di 45/48 kDa di tipo I, appartenente alla famiglia dei recettori per il TNF, molecole in grado di indurre morte cellulare programmata attivando la cascata delle CASPASI (proteasi cisteina-dipendenti aspartato-specifiche). Il recettore Fas è caratterizzato da tre domini ricchi in cisteina (CRDs) nel dominio extracellulare e da una sequenza citosolica di 80 aminoacidi chiamato death domain (DD), in grado di interagire con altri domini DDs presenti su altre proteine. Il suo ligando naturale, FasL è una proteina trimerica di superficie di tipo II, che può essere rilasciata in forma solubile tramite una digestione mediate da metalloproteinas.

Il sistema Fas/FasL è il sistema meglio caratterizzato nello spegnimento della risposta immunitaria. I linfociti T citotossici uccidono il loro bersaglio attivandone l'apoptosi grazie all'interazione fra il FasL presente sulla loro membrana plasmatica e il recettore Fas presente sulla superficie delle cellule bersaglio. Inoltre l'attivazione dei linfociti fa sì che essi comincino ad esporre grandi quantitativi di recettore Fas, diventando così suscettibili alla loro regolazione negativa da parte di altri linfociti o altre cellule che esprimono FasL.

Le caspasi [15-17].

Le caspasi sono una famiglia di proteasi in grado di idrolizzare proteine bersaglio in corrispondenza di una sequenza consenso contenente acido aspartico ed hanno un sito attivo ricco di residui di cisteina. Le caspasi sono coinvolte in differenti aspetti della morte cellulare programmata, idrolizzando precursori di citochine al fine di attivarli, innescando la propagazione di segnali apoptotici e realizzando il programma apoptotico mediante l'attivazione di processi trascrizionali e mediante scissione diretta di proteine fondamentali per la cellula. Le caspasi coinvolte nella cascata del segnale indotta da Fas, possono essere suddivise in iniziatrici, che agiscono nella prima fase del processo ed hanno effetto reversibile, ed effettrici, irreversibilmente coinvolte nel processo apoptotico.

Tutte le caspasi sono sintetizzate sotto forma di precursori inattivi (zimogeni), che vengono attivati grazie al taglio proteolitico, autocatalitico o mediato da altre caspasi, della porzione inibitoria del precursore.

Trasduzione del segnale Fas mediata [18-30].

Il segnale apoptotico indotto dal sistema Fas può essere suddiviso in due vie fra loro ben differenziate: la via estrinseca, in cui viene direttamente coinvolta l'attivazione della cascata delle caspasi da parte del recettore Fas, ed una via intrinseca, che invece coinvolge il mitocondrio.

Nella via estrinseca, il legame ligando-recettore induce la formazione di un composto trimolecolare denominato DISC (death inducing signaling complex), nel quale Fas e la molecola adattatrice FADD (Fas associated death domain) interagiscono direttamente tramite i loro domini DD, e FADD recluta le procaspasi-8/-10 tramite un motivo di interazione proteina-proteina chiamato DED (death effector domain). La formazione del DISC permette la digestione autocatalitica delle procaspasi-8/-10 ed il rilascio delle caspasi attive sotto forma di eterotetrameri formati da due subunità grandi e due piccole. Le caspasi iniziatrici così attivate avviano la cascata del segnale fino all'attivazione delle caspasi effettrici -3,-6 e -7, che guidano il programma di morte cellulare. La caspasi-8 agisce anche da ponte per collegare la via estrinseca con quella intrinseca. Fra i suoi substrati, infatti, è presente la proteina citosolica Bid, molecola proapoptotica appartenente alla famiglia di Bcl-2, che, una volta clivata dalla caspasi-8, rilascia un frammento (tBid) in grado di traslocare nel mitocondrio e attivare il processo intrinseco. Il processo di attivazione del segnale Fas mediato è in grado, inoltre, di attivare delle sfingomielinasi acide e produrre ceramide, in grado di alterare la membrana mitocondriale, attraverso la produzione di GD3 ganglioside.

L'evento fondamentale del processo mediato dal frammento tBid e dalla ceramide è l'alterazione del potenziale della membrana mitocondriale con conseguente rilascio del citocromo *c*. Il citocromo *c* così diffuso nel citosol, si lega alla molecola adattatrice APAF-1 (apoptotic protease-activating factor-1), rendendola in grado di reclutare la procaspasi-9. Viene così a formarsi un complesso multimolecolare costituito da APAF-1, citocromo *c*, dATP e procaspasi-9 definito *apoptosoma*.

Come accade per il DISC e le caspasi-8/-10, la formazione dell'apoptosoma permette l'attivazione della caspasi-9, tramite taglio autocatalitico, e la conseguente attivazione delle caspasi effettrici .

Inibitori della trasduzione del segnale dipendente da Fas [31-41].

Molte proteine inibitrici appartenenti alle famiglie FLIP, IAP e Bcl2 agiscono sulla cascata del segnale indotta da Fas a differenti livelli della cascata. La proteina c-FLIP, con le sue due forme C-FLIPs (short) e c-FLIP1 (long), interagisce con l'adattatore FADD o direttamente con la procaspasi-8 grazie a due domini DEDs (la forma long possiede anche un dominio caspasi-simile omologo a quello della caspasi-8), ma mancando di attività catalitica è in grado di bloccare la formazione del corretto DISC e quindi blocca l'attivazione della caspasi-8 stessa. Alti livelli di c-FLIP sono rilevabili in linfociti quiescenti e nelle prime fasi di attivazione sono correlate con la resistenza di queste cellule all'induzione Fas-mediata di apoptosi. Nelle fasi più avanzate dell'attivazione linfocitaria, l'espressione basale di c-FLIP viene a calare sensibilmente, rendendo così i linfociti suscettibili all'azione del sistema Fas/FasL.

I membri della famiglia delle IAPs (c-IAP1, C-IAP2 e XIAP) agiscono sequestrando le caspasi grazie alla presenza di domini BIR (baculovirus inhibitor repeat), in particolare bloccando l'azione delle caspasi-3, -7 e -9. Tra queste molecole quella che riveste maggior interesse è XIAP che è in grado di inibire l'attivazione della caspasi-9 e bloccare l'azione della caspasi-3 già attivata.

La regolazione della cascata delle caspasi attuata dall'azione delle IAPs, è a sua volta finemente regolata tramite una proteina mitocondriale denominata Smac (DIABLO), che, in seguito a stimoli apoptotici, viene rilasciata nel citosol in contemporanea alla diffusione del citocromo *c*. In tal modo, mentre il citocromo *c* si lega ad APAF-1 e porta alla formazione dell'apoptosoma, Smac inattiva le IAPs agevolando l'attivazione delle caspasi-3 e -9.

La famiglia di Bcl-2 comprende diverse molecole ad azione anti-apoptotica (Bcl-2 e Bcl-XL) o pro-apoptotica (Bax, Bcl-XS, BAK). I vari membri di questa famiglia possono formare omodimeri (es. Bcl2/Bcl2), oppure eterodimeri, interagendo con altre molecole della stessa famiglia (Bcl2/Bax), e il grado di omeostasi che si viene a creare fra queste differenti interazioni, ne regola l'attività pro- o anti- apoptotica.

XIAP: Struttura e funzione [42-68]

XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) è costituita da 497 amminoacidi e con un peso molecolare di circa 56 kD, è codificata da un gene costituito da 7 esoni localizzato sul braccio lungo del cromosoma X (Xq25).

XIAP è definita anche BIRC4 (Baculoviral IAP Repeat Containing 4), poiché la proteina è stata descritta per la prima volta in una particolare specie virali, quella dei Baculovirus. In questi virus la molecola agisce bloccando l'apoptosi, innescata dalle cellule come meccanismo di difesa nei confronti dell'infezione virale.

XIAP contiene due tipi di sequenze conservate: i domini BIR, localizzati nella porzione amino-terminale della molecola, e il dominio RING nella regione carbossi-terminale.

Recenti studi genetici mostrano come i tre domini BIR di XIAP siano essenziali per le funzioni inibitorie che la proteina esercita sia sulla caspasi-9 (iniziatrice), sia su quelle esecutrici -3 e -7.

La regione linker tra il BIR1 e il BIR2 è importante per il legame con caspasi-3 e -7. Gli amminoacidi della regione linker che precede il BIR2 legano il sito attivo di caspasi-3 e -7 con orientamento anti-parallelo, inibendo l'attività enzimatica di queste caspasi. Il residuo D148 risulta essere di grande importanza perché possa attuarsi tale legame.

Il meccanismo con cui XIAP è in grado di inibire anche la caspasi-9 risulta essere fondamentalmente differente da quello che coinvolge le caspasi esecutrici. XIAP interagisce con la caspasi-9 tramite una tasca idrofobica presente nel BIR3, che viene occupata dai primi quattro amminoacidi della caspasi-9 processata (subunità p12), in particolare il residuo W310 nel BIR3 risulta essere critico per tale legame. XIAP è l'unica IAP in grado di bloccare la caspasi-9.

La funzione del primo dominio BIR di XIAP è ancora sconosciuta e non esistono dati per dimostrare che tale regione possa bloccare l'azione delle caspasi; infatti, la proteina tronca, contenente solo il dominio BIR1, non è in grado di interagire con le caspasi esecutrici e, di conseguenza, non può inattivare il sistema Fas che porta all'apoptosi. Un'ipotesi attribuisce a BIR1 un'azione di stabilizzazione dell'intera proteina.

Per quanto riguarda il dominio RING di XIAP, esso sembra conferire un'attività E3-ligasica e promuovere la propria auto-degradazione, inoltre determina la degradazione proteasomica di una molecole quali caspasi-3 e Smac.

XIAP è ubiquitariamente espresso in tutti i tessuti normali e può a sua volta essere clivato dalle caspasi, soprattutto nel momento in cui i linfociti T vanno incontro ad apoptosi.

L'attività antiapoptotica di XIAP può essere soppressa da due proteine mitocondriali Smac/DIABLO e Omi/HtrA2. Queste molecole vengono rilasciate dal mitocondrio nel citoplasma durante l'apoptosi e si legano a XIAP a livello della tasca idrofobica presente sul BIR3, la stessa alla quale si lega caspasi-9, poiché la sequenza tetrapeptidica nella porzione ammino-terminale di queste molecole è molto simile a quella della subunità p12. Ciò rende il legame di queste tre molecole con XIAP mutualmente esclusivo.

XIAP e traduzione del segnale

I livelli di espressione di XIAP appaiono inoltre ben regolati a livello post-trascrizionale e la traduzione della proteine viene regolata in seguito a stress fisiologico.

Oltre al ruolo di inibitore della caspasi, XIAP interviene in altre vie di segnale della cellula. E' stato dimostrato come l'espressione ectopica di XIAP attivi la via di JNK (N-terminal c-Jun Kinase) contribuendo all'effetto protettivo nei confronti dell'apoptosi, probabilmente come risultato dell'interazione di XIAP con TAB1 e ILPIP, che attivano la MAP3 kinasi TAK1. Altri studi hanno cercato di spiegare l'azione di XIAP nella via di NF-kB (transcription factor nuclear factor-kB). L'attivazione di NF-kB nelle cellule endoteliali avviene per attivazione della Ikb kinasi da parte di TAK1.

Oltre a questo, Xiap risulta essere coinvolto nel differenziamento cellulare. E' infatti riportato in letteratura come l'espressione di Xiap venga up-regolata durante il differenziamento dei monociti in macrofagi.

Lewis et al. hanno dimostrato che le proprietà di XIAP come inibitore delle caspasi o come molecola coinvolta nella trasduzione del segnale sono ben distinte e indipendenti l'una dall'altra.

Il modello murino di XIAP

Nel tentativo di comprendere la funzione di XIAP nelle cellule normali, sono stati generati topi in cui il gene è stato inattivato (XIAP^{-/-}). Topi knock-out per XIAP sono nati con la frequenza mendeliana attesa senza evidenti difetti fisici e l'analisi istologica su tessuti selezionati (cuore, fegato, rene, polmone e cervello) non ha evidenziato alcuna differenza rispetto ai topi wild type. Non è stata, inoltre, osservata alcuna variazione nell'apoptosi mediata da Fas. Da un punto di vista biochimico le cellule murine, private del gene per XIAP, presentano incrementati livelli di c-IAP1 e c-IAP2; questo dato suggerisce che esista un meccanismo compensatorio dell'espressione degli altri membri della famiglia, quando quella di XIAP è deficitaria.

INTRODUZIONE II

Le sindromi autoinfiammatorie [69-72].

Le febbri periodiche sono un gruppo di malattie caratterizzate da episodi ricorrenti di infiammazioni sistemiche, che durano da qualche giorno ad alcune settimane, con intervalli asintomatici di durata variabile. Le cosiddette *sindromi autoinfiammatorie* sono disordini sistemici caratterizzati da infiammazione apparentemente spontanee, in assenza di autoanticorpi ad alto titolo o linfociti T antigene-specifici, fra queste sindromi le maggiormente conosciute sono la sindrome da Iper-IgD (HIDS) e la sindrome periodica associata al recettore per il TNF (TRAPS).

L'HIDS è caratterizzata da febbre ricorrente che di solito inizia entro la fine del primo anno di vita. L'attacco febbrile è preceduto da brividi, seguiti da rapido aumento della temperatura, e termina dopo 4-6 giorni con graduale defervescenza. Può essere scatenato da vaccinazioni, infezioni virali, traumi minori e stress. L'attacco si accompagna spesso a linfadenopatia laterocervicale, dolori addominali, epatosplenomegalia, artralgie e cefalea.

Fra un attacco e l'altro i pazienti sono pressoché asintomatici, e gli attacchi si ripetono generalmente ogni 4-6 settimane, con ampia variabilità tra un paziente e l'altro. L'HIDS viene ereditata in modo autosomico recessivo e la frequenza di suscettibilità è bassa, il che spiega perché il disordine non viene osservato nei genitori e nella prole dei pazienti affetti. Il gene di suscettibilità alla HIDS si trova sul braccio lungo del cromosoma 12. Questo dato, in parallelo con la fortuita determinazione degli aumentati livelli di acido mevalonico presente nelle urine durante gli attacchi febbrili, ha portato all'identificazione di mutazioni a carico del gene della mevalonato chinasi (MK) come causa della sindrome. La maggior parte dei pazienti con HIDS è eterozigote per la mutazione nel gene della MK. Una mutazione, V3771, è presente in più dell'80% dei casi e causa una lieve riduzione della stabilità della proteina e dell'attività catalitica dell'enzima. Come una deficienza di MK possa essere responsabile di una sindrome febbrile episodica non è ancora completamente spiegato. Dati recenti hanno dimostrato che mutazioni nel gene MK influenzano la stabilità e/o la maturazione della MK stessa, in modo temperatura dipendente. Ad elevate temperature, infatti, si verifica una maggiore diminuzione dell'attività della MK, il che potrebbe spiegare l'andamento periodico della febbre.

A differenza della HIDS, la TRAPS viene ereditata in modo autosomico dominante (la mutazione interessa il gene codificante per il recettore del TNF, situato sul braccio corto del cromosoma 12), con il risultato di un ridotto clivaggio attivazione-indotto della forma mutante, e la conseguente diminuzione dei livelli sierici del recettore solubile, che potrebbe avere un ruolo chiave nell'omeostasi del TNF. La TRAPS è caratterizzata da febbre ricorrente, mialgie localizzate e lesioni cutanee dolenti al torso e alle estremità.

Gli attacchi febbrili durano almeno uno o due giorni, ma possono protrarsi per settimane. La TRAPS si differenzia dalla HIDS per la maggior durata degli attacchi febbrili nella maggioranza dei casi descritti, per la congiuntivite e per le mialgie, ma a volte il quadro clinico è molto sfumato essendo caratterizzato solo dalla ricorrenza di febbre.

Nell'ambito delle malattie infiammatorie croniche non infettive ereditarie entrano nella diagnostica differenziale anche la febbre mediterranea familiare (FMF), dovuta ad alterazioni del gene MEFV (mediterranean fever), situato sul braccio corto del cromosoma 16 e, non ancora ben caratterizzate, l'orticaria familiare da frigore (OFaF) e la sindrome di Muckle-Wells (SMW).

PREMESSE E SCOPO

Benché molto si conosca riguardo alla sindrome autoimmune linfoproliferativa, la ricerca di nuovi geni e prodotti proteici coinvolti nello sviluppo della malattia rimane un punto interessante da sviluppare. Infatti, risultano molto pochi i geni che si sono potuti associare direttamente alla malattia e che sono stati finora caratterizzati. Un ampio gruppo di casi è stato riunito in quella che viene definita ALPS 1 e che presentano tutte alterazioni geniche a carico del gene codificante per il recettore Fas, mentre nella patogenesi della sindrome ALPS 2 le alterazioni sono a carico del gene codificante per la caspasi-10.

Rimane tuttavia un grande gruppo di casi (ALPS 3), in cui le alterazioni geniche coinvolte non sono ancora state identificate. In questo ambito, il nostro laboratorio ha individuato una sindrome ALPS-simile, definita DALD (*Dianzani's Autoimmune lymphoproliferative disease*) che, pur manifestando sintomi diagnostici identici all'ALPS, manca dell'espansione periferica dei linfociti DN. Anche nei pazienti DALD non sono ancora stati identificati geni coinvolti nella patogenesi.

Pur non essendo correlati con lo sviluppo di ALPS, tuttavia, sono state identificate alterazioni a carico di geni codificanti per proteine coinvolte nella trasduzione del segnale apoptotico Fas mediato. È stato individuato un paziente, inizialmente sospetto ALPS, nel quale era presente una alterazione a carico del gene codificante per il FasL. Il paziente non è poi risultato essere affetto da ALPS per via dell'età di diagnosi (il paziente era già in età adulta) e della mancanza di molti sintomi caratteristici della malattia. Una seconda mutazione a carico invece del gene codificante per la caspasi-8, è stata invece ritrovata in un paziente affetto da immunodeficienza e i cui linfociti non rispondevano all'attivazione indotta da stimoli antigenici.

L'esistenza di tali alterazioni in proteine coinvolte nella trasduzione del segnale Fas mediato ci fa supporre che nella patogenesi di ALPS o DALD, possano essere coinvolti più fattori. Un supporto a tale idea viene direttamente dall'analisi di alcuni quadri familiari di pazienti ALPS 1. In questi quadri si può notare come il paziente abbia ereditato la mutazione per il recettore Fas in eterozigosi, da uno dei due genitori, il quale però, pur essendo resistente ad apoptosi indotta da Fas, è pur sempre sano, ed una seconda mutazione ancora sconosciuta dall'altro genitore, che, pur avendo il gene codificante per Fas non alterato, risulta essere anch'egli resistente ad apoptosi, purché sano.

Ricercando possibili geni candidati coinvolti nella patogenesi della malattia (ALPS/DALD), sono stati individuati nel nostro laboratorio due pazienti portatori di mutazioni a carico del gene codificante per XIAP, che ne alterano l'espressione o la funzionalità. L'aver, inoltre, notato che tali pazienti erano spesso soggetti a ripetuti attacchi febbrili, ha fatto sì che il nostro interesse si concentrasse sulle malattie autoinfiammatorie, le sindromi da febbre ricorrente. In particolare ci siamo concentrati su un gruppo di pazienti che, pur manifestando i classici quadri clinici della malattia, risultano non aver alterazioni a carico dei geni risaputi essere direttamente coinvolti in tali malattie.

Scopo del mio progetto di dottorato verte sull'individuazione di mutazioni o polimorfismi che possono alterare la funzionalità di proteine regolatrici, quale XIAP, del segnale apoptotico Fas mediato.

MATERIALI E METODI

Pazienti.

Per la ricerca di geni coinvolti nell'ALPS-III sono stati reclutati in prima analisi quindici pazienti ALPS appartenenti alla popolazione italiana.

La diagnosi di ALPS è stata fatta sulla base dei seguenti criteri

- 1) presenza di citopenia autoimmune a carico di una o più linee ematologiche;
- 2) presenza di linfadenopatie croniche non maligne (due o più linfonodi ingrossati con un diametro superiore ai 2 cm) e/o splenomegalia;
- 3) deficit apoptotico di Fas *in vitro*;

I campioni di sangue periferico e di siero sono stati ottenuti dai pazienti e da controlli sani con consenso informato e lo studio è stato approvato dal locale comitato etico.

Sono stati inoltre reperiti campioni di DNA genomico di 40 pazienti affetti da sindrome da febbri ricorrenti, di 55 pazienti con sclerosi multipla, di 88 pazienti ALPS e di controlli sani con consenso informato.

Separazione dei linfociti su gradiente di Ficoll.

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state purificate su gradiente di Ficoll. Questa metodica consiste nella stratificazione del campione di sangue su una soluzione a base di Ficoll (zucchero simile al saccarosio) ad alta densità, sottoponendo poi il campione a centrifugazione per la separazione dei tipi cellulari su gradiente. Al termine della centrifugazione risultano stratificate le differenti specie cellulari, in base alla loro massa e quindi alla capacità di migrare all'interno della matrice zuccherina. Gli eritrociti sedimentano sul fondo della provetta, la componente mononucleata del sangue rimane sedimentata subito al di sopra della soluzione di Ficoll (anello di linfociti e monociti/macrofagi), mentre la parte superiore della provetta è costituita da siero e piastrine. Una volta recuperato l'anello di linfociti ed eliminati residui di Ficoll e piastrine tramite una serie di lavaggi con PBS 1x, le cellule vengono contate su camera di Burker e sono pronte per essere poste in coltura. Le cellule vengono coltivate in terreno RPMI 1640 (Invitrogen) addizionato del 10% di siero fetale bovino (FBS) e di IL-2

(da 2 a 10U/ml) (Sigma), necessaria a fornire gli stimoli trofici ai linfociti T. La proliferazione dei linfociti è garantita dalla presenza, nel terreno di coltura, di fitoemoagglutinina (PHA- Sigma), uno stimolo aspecifico del TCR.

Arricchimento di monoliti da PBMC tramite aderenza.

Per l'arricchimento e la purificazione dei monociti da PBMC estratti da sangue periferico, viene sfruttata la capacità intrinseca di queste cellule di aderire alle superfici. I PBMC estratti vengono portati ad una concentrazione di $7,5 \times 10^6$ cellule / ml in terreno RPMI 1640 completato con 5% FBS, 10 mM HEPES e quindi lasciati incubare per 2 ore a 37°C. Al termine dell'incubazione le cellule non aderenti vengono eliminate dalla coltura tramite 2 lavaggi con terreno a temperatura ambiente. I monociti rimasti adesi dopo i lavaggi, vengono staccati tramite l'utilizzo di uno *scraper* sterile, contati e quindi seminati in terreno per il differenziamento per macrofagi.

Differenziamento dei macrofagi da monociti.

I monociti vengono portati ad una concentrazione di 5×10^5 cellule/ml di terreno RPMI con 5% FBS, 10mM HEPES addizionato di 800u/ml GM-CSF (Granulocyte/Macrophages-Colony-Stimulating-Factor) (PeproTech), che ne permette il differenziamento in macrofagi. Le cellule, seminate in piastra multiwell da 24 pozzetti, vengono lasciati differenziare per 5 giorni a 37°C, ricostituendo la citochina di differenziamento al secondo giorno di coltura.

Saggio di produzione di anione superossido.

Al quinto giorno di differenziamento, i macrofagi provenienti da ciascun soggetto analizzato, sono stati divisi in tre campioni, due dei quali (A e B) sono stati coltivati per altre 48 ore con il semplice terreno di differenziamento, mentre l'ultimo (S) è stato stimolato in presenza di LPS (lipopolisaccaride batterico) (Sigma) 1µg/ml. Al termine delle 48 ore le cellule sono state lavate ed incubate per un'ora in terreno RPMI 1640 privo di rosso fenolo, in presenza di citocromo c (Sigma) 1 mg/ml. Il citocromo c presente nella soluzione e che viene ridotto a seguito di produzione di anione superossido, permette inoltre di poter valutare il campione direttamente allo spettrofotometro (550 nm), come

viraggio di colori rispetto ad un bianco (solo terreno). Per ottenere una produzione di anione superossido misurabile, i campioni B e S sono stati stimolati durante l'incubazione con PMA (forbolo-12-miristato-13-acetato) (Sigma) ad concentrazione 10^{-7} M. Il campione A di controllo, che fornisce i valori di produzione di anione superossido in assenza di PMA, è stato incubato in presenza di SOD (super-ossido dismutasi) (Sigma) 1mg/ml. La produzione di anione superossido dei macrofagi attivati è stata valutata come nanomoli di citocromo *c* ridotto dal campione stimolato S in un'ora di incubazione rispetto al campione B. Usando come coefficiente di estinzione 21,1 mM è stato possibile ricavare le nanomoli di citocromo *c* ridotto in un'ora da 10^6 cellule.

Capacità allostimolatoria dei macrofagi in coltura linfocitaria mista (MLR).

La capacità allostimolatoria dei macrofagi differenziati è stata valutata co-incubando gli stessi, attivati o non con LPS, con linfociti allo genici in rapporto 1:20. In particolare, 10^5 linfociti sono stati coltivati con 5×10^4 macrofagi in 200 ml di terreno RPMI completato con 10% FBS per 5 giorni. Per valutare l'avvenuta proliferazione dei linfociti in seguito alla stimolazione dei macrofagi, nelle ultime 6 ore di coltura viene aggiunta timidina triziata $^3\text{H-TdR}$ (Amersham). I campioni vengono quindi analizzati in un contatore per emissioni β .

Analisi immunofenotipica.

Per tutti i campioni di sangue pervenuti è stata analizzata l'espressione di molecole di superficie tramite immunofluorescenza diretta e citometria a flusso (FACScalibur, Becton Dickinson). Le cellule sono state incubate con anticorpi monoclonali, marcati con differenti fluorocromi, diretti contro CD3, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$ (Becton Dickinson) e Fas/CD95 (Chemicon).

La percentuale di linfociti T CD4/CD8 doppi negativi (DN), tipicamente espansa nei pazienti ALPS, è stata valutata utilizzando anticorpi anti-TCR $\alpha\beta$ coniugato FITC, anti-CD4 coniugato PE e anti-CD8 coniugato PP. Le fluorescenze sono state analizzate con il programma CellQuest selezionando le cellule positive per l'anticorpo anti-TCR $\alpha\beta$ e, fra queste, la popolazione che risultava negativa per gli anticorpi anti-CD4 e anti-CD8.

Saggio di morte.

La morte cellulare indotta dallo stimolo di Fas o etoposide è stata valutata su linee cellulari T, ottenute da PBMC, attivati con 1 µg/ml (t=0) e 0,1 µg/ml (t=12) di PHA e coltivate in RPMI 1640 con 10% FBS in presenza di 2 U/ml IL-2.

La funzionalità di Fas ed etoposide è stata valutata 6 giorni dalla seconda stimolazione (t=18 di coltura). Le cellule (5×10^4 /pozzetto) sono state incubate con mAb anti-Fas (1µg/ml) (clone CH11, ditta Upstate) o con etoposide (2 µg/ml) (Sigma) in presenza di rIL-2 (1U/ml), per minimizzare la morte cellulare spontanea, e con 5% FBS per impedirne la proliferazione.

La mortalità cellulare è stata valutata 16 ore dopo, contando le cellule vive in ciascun pozzetto mediante il test di esclusione con il Tripan Blue. Linfociti derivati da due soggetti sani sono stati inclusi in ciascun test come controllo positivo dell'esperimento.

I risultati sono stati espressi come mortalità cellulare relativa espressa in percentuale, calcolati secondo la seguente formula: $[100 - (\text{cellule vive dopo trattamento con lo stimolo di morte} / \text{cellule vive senza stimolo})] \times 100$.

Il limite superiore di normalità per la morte cellulare in risposta ad anticorpo anti-Fas o etoposide è stato definito come media + 2 DEV.ST dei dati ottenuti da 80 controlli sani; i risultati che si ponevano nel range definito dalla media + 1 DEV.ST e la media + 2 DEV.ST sono state definite come 'borderline'.

Saggi di attività caspasi.

PBMC derivati dai pazienti sono stati coltivati in terreno RPMI 1640 con 10% FBS in presenza di 10 U/ml IL-2 e attivati con 1 µg/ml (t=0) e riattivati con 0,1 µg/ml (t=8) di PHA. Al 4° giorno dopo la ristimolazione (t=12) 6×10^6 cellule sono stati incubati con etoposide (5 µg/ml) in terreno RPMI 1640 con 5% FBS in ghiaccio per 30 minuti, successivamente trasferite a 37°C per 6 ore, quindi lavate con PBS 1x e congelate. Il pellet di cellule congelato è stato successivamente lisato con Lysis buffer (MBL), e il lisato ottenuto, utilizzato per analizzare l'attività specifica della caspasi-9. Il kit utilizzato (Caspase-9 Fluorometric Assay Kit, MBL) prevede, l'incubazione di 50 µg di lisato totale in tampone in presenza di un substrato specifico (LEHD-AFC) che, soggetto all'azione proteolitica delle caspasi, è in grado di emettere fluorescenza. La fluorescenza emessa dai campioni, a seguito di incubazione per 1 ora a 37°C, vengono rilevati tramite l'utilizzo di

un fluorimetro (FluoroCount, Biorad) con filtri ad eccitazione 425 nm ed emissione 530 nm. Due o più lisati di controllo, derivati da controlli sani, sono stati analizzati in parallelo per ciascun esperimento, per definire il range di normalità.

Elettroforesi su gel di agarosio.

Il gel è stato preparato sciogliendo l'agarosio (1,5%) in Tampone Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1% contenente bromuro d'etidio. L'esposizione agli UV del gel permette il rilevamento del DNA grazie alla fluorescenza emessa dall'etidio bromuro incorporato dal campione.

Estrazione da gel di agarosio.

Le bande d'interesse sono state tagliate da gel e il DNA estratto dalla matrice con il kit Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf).

Il kit utilizzato prevede (A) l'estrazione della banda interessata dalla matrice del gel tramite solubilizzazione dello stesso in tampone contenente Sodio Ioduro, (B) la purificazione del campione di DNA tramite legame su resina specifica a scambio ionico ed eliminazione delle impurità (agarosio, proteine, sali) tramite lavaggi con un tampone contenente etanolo e (C) eluizione del campione purificato in tampone acquoso.

Questa metodica permette la purificazione di frammenti di DNA prodotti per PCR e da reazioni enzimatiche quali digestioni e ligazioni.

Sequenziamento automatico.

I prodotti di PCR, sono stati purificati dall'eccesso di primers e di nucleotidi non incorporati, utilizzando gli enzimi Exo (1 unità) e SapI (5 unità) (ditta USB) tramite un ciclo di incubazione di 20' a 37°C e uno di 20' a 80°C.

Le reazioni di sequenziamento sono quindi state ottenute servendosi del kit specifico ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v1.1 (Applied Biosistem), dotati di dideossinucleotidi ciascuno legato ad un fluorocromo differente. Seguendo il protocollo consigliato dalla ditta, per un volume finale di reazione di 10 µl, sono stati addizionati al DNA purificato, 2 µl di BigDye Sequencing Buffer (in

dotazione con il kit) , il primer (3,2 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$). La reazione di sequenziamento prevede l'utilizzo del seguente programma:

96°C 1'	}	1 ciclo
96°C 10''		
50°C 5''	}	25 cicli
60°C 4'		

Il prodotto della reazione è stato purificato, al fine di eliminare gli oligonucleotidi non incorporati, mediante il kit Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup (Montage). 5 μl del purificato sono stati addizionati a 10 μl di formammide e denaturati (3' a 95°C), quindi caricati su piastra ottica per la successiva analisi al sequenziatore.

Estrazione dell'RNA e reazione di retrotrascrizione (RT-PCR).

L'RNA del controllo omozigote per il polimorfismo del gene XIAP è stato estratto con il Minikit Rneasy (Qiagen, Hilden, Germany) partendo da linfociti, seguendo il protocollo fornito con il kit.

Dopo quantizzazione spettrofotometrica con raggi U.V. alla lunghezza d'onda di 260nm, 5 μg di tale RNA sono stati utilizzati come stampo per generare la prima elica di cDNA, tramite impiego del ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen).

Questa metodica consiste in una prima fase di denaturazione delle strutture secondarie dell'RNA condotta a 65°C per 5'. L'oligodT presente nella miscela è utilizzato come innesco della reazione di retrotrascrizione. Il campione viene quindi trasferito in ghiaccio, che permette l'appaiamento tra l'oligonucleotide e il suo stampo. Al campione vengono aggiunti: il Buffer di reazione 5X (compreso nel kit), il ditiotritolo (DTT), un inibitore delle Rnasi, RNaseOUT™ , e 1U di trascrittasi inversa ThermoScript™RT. L'acqua utilizzata durante la manipolazione dell'RNA è stata trattata con DietilPirocarbonato (DEPC). Il ciclo di reazione prevede 1 h a 60°C e 5' a 85°C per eliminare l'RNA.

Amplificazione del cDNA codificante per il gene XIAP polimorfico.

Per ottenere i costrutti, le due forme polimorfiche c1268A e c1268C sono state amplificate tramite PCR utilizzando oligonucleotidi specifici *forward* e *reverse*.

Data la lunghezza eccessiva del cDNA codificante per XIAP, il costrutto è stato ottenuto amplificando singolarmente due frammenti genici (il primo con gli oligonucleotidi *forward-L* e *reverse-O*, il secondo con gli oligonucleotidi *forward-P* e *reverse-Q*) con oligonucleotidi (*reverse-O* e *forward-P*) sovrappendenti.

I frammenti ottenuti, rispettivamente di 1200 bp e 450 bp, sono stati digeriti tramite enzimi di restrizione e utilizzati per una reazione di ligazione a tre con il vettore pEGFP-C2 (Clontech).

Digestione enzimatica e ligazione.

1-3 µg di DNA plasmidico e di cDNA codificante per XIAP (forma c1268A e c1268C, ottenuti mediante PCR sul cDNA del paziente) sono stati digeriti per 2 ore a 37°, in presenza degli enzimi di restrizione (1-2 U di enzima /µg DNA), il tampone specifico 10x fornito dalla casa produttrice ed acqua sterile.

Gli enzimi di restrizione utilizzati sono: EcoRI, presente al 3' de costrutto, Xho presente al 5' del costrutto e EcoRV interno al gene poco distante dal sito polimorfico.

I frammenti di DNA (inserti) ed il vettore, opportunamente digeriti con gli enzimi di restrizione e purificati, sono stati covalentemente legati mediante azione della T4 DNA ligasi (Invitrogen). La miscela di reazione è composta dal DNA che si vuole clonare (inserto) e dal vettore con un eccesso del primo rispetto al secondo (in rapporto 3:1), la ligasi (1-2 U di T4 DNA), il tampone 5X (fornito dalla casa produttrice dell'enzima) ed acqua sterile.

La reazione è stata condotta a 22° C per 2 ore. Per ciascuna delle reazioni enzimatiche realizzate era previsto un controllo di re-ligazione, del vettore su se stesso, in cui la miscela di reazione conteneva la ligasi, il tampone 5X, l'acqua ed il vettore digerito, ma non veniva aggiunto l'inserto.

Trasformazione batterica.

Come recipiente dei plasmidi originati, è stato utilizzato il ceppo batterico *Escherichia coli*, specie JM109, reso competente, fornito dalla ditta Promega. A 20 µl di batteri competenti è stato aggiunto il prodotto di ligazione e la miscela è stata incubata 20' in ghiaccio. L'ingresso del vettore nella cellula batterica è stato indotto con uno shock termico (37°C per 5'), quindi le cellule vengono incubate 30' in terreno liquido a 37°C al fine di fornire loro il tempo necessario a produrre acquisire la resistenza ad ampicillina (antibiotico utilizzato poi nel terreno di selezione). I batteri sono stati piastrati su piastre Petri contenenti il terreno selettivo (LB-agar-ampicillina 50 µg/ml) e lasciati crescere 12-18 ore a 37°C.

L'inserto clonato è stato controllato mediante PCR, utilizzando i primers XIAP-P e XIAP-Q (per amplificare la regione contenente il polimorfismo) sia per le colonie c1268A che c1268C, e sequenziato per verificare l'assenza di mutazioni.

Estrazione del DNA plasmidico.

Per la preparazione dei plasmidi è stato utilizzato il kit di estrazione QIAGEN Plasmid Midi (QIAGEN) che si basa sulla lisi alcalina delle cellule batteriche, cresciute in terreno selettivo contenente ampicillina a 37°C in agitazione per 12-16 ore, seguita dall'adsorbimento del DNA su di una resina a scambio ionico. Le proteine e le impurità vengono rimosse tramite lavaggio ed il DNA plasmidico purificato viene eluito mediante variazione di pH. Il DNA viene quindi concentrato e desalificato tramite precipitazione in isopropanolo e successivamente recuperato in tampone acquoso e quantizzato allo spettrofotometro.

Trasfezione transiente in cellule 293T.

Le cellule 293T (cellule embrionali renali umane) sono state coltivate in adesione in capsule Petri, in terreno DMEM + 10% FBS, in incubatore a 37°C umidificato al 5% di CO₂ fino ad ottenere una confluenza del 90-95%. Sono state trasfettate mediante lipide cationico, utilizzando il kit Lipofectamina 2000 (Invitrogen), seguendo il protocollo fornito dalla ditta. 15 µg di DNA sono stati diluiti in 500 µl di terreno Opti-MEM (terreno consigliato per ottenere un'alta efficienza di trasfezione) e lasciati incubare a temperatura

ambiente per 5'. Contemporaneamente 20 µl di Lipofectamina 2000 sono stati diluiti in 500 µl dello stesso terreno e incubati a temperatura ambiente per lo stesso periodo di tempo. Le due diluizioni sono state riunite e incubate per 20' a temperatura ambiente e successivamente aggiunte goccia a goccia al terreno di coltura.

Nel nostro caso sono state effettuate tre trasfezioni in parallelo utilizzando: (A) il costrutto pEGFP-XIAP-c1268A, (B) il costrutto pEGFP-XIAP-c1268C e (C) il vettore vuoto (mock) come controllo della trasfezione.

Western Blot

Le cellule sono state lisate per estrarne le proteine totali, risospingendole in 100-150 µl di buffer di lisi cellulare (cod. BV-118-3) commercializzato dalla MBL International Corporation. Dopo un'incubazione di 30' in ghiaccio, è stata eseguita una centrifugazione a 12000 rpm a 4°C per 15'. Il surnatante così ottenuto rappresenta l'estratto proteico che viene dosato mediante l'uso di Protein Assay (Biorad), una variante del metodo Braedford.

150 µg di proteine di estratto cellulare sono stati separati mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 10% secondo protocollo standard (*current protocols in molecular biology*).

I campioni sono stati quindi trasferiti su filtro di nitrocellulosa (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences) per 1,5 ore a 100V in tampone di trasferimento (Tris base 3g/l, Glicina 14,4 g/l, SDS 1 g/l, Metanolo 10%). Per verificare l'avvenuto trasferimento delle proteine dal gel alla nitrocellulosa, la membrana è stata colorata con Rosso Ponceau (Sigma Aldrich) e poi lavata con TBS (Tris base 24,2 g/l, NaCl 80 g/l pH 7,6) 1% Tween-20. La nitrocellulosa viene quindi saturata con una soluzione di 5% latte in polvere sciolto in TBS-T, e quindi incubata 2 ore a temperatura ambiente oppure 16 ore a +4°C con anticorpo primario specifico diluito in TBS-T 5% latte o BSA. Successivamente il filtro di nitrocellulosa è stato incubato con anticorpo secondario coniugato ad HRP (perossidasi di rafano) per 1 ora. Dopo 3 lavaggi in TBS-T, il filtro viene incubato con i substrati specifici per chemiluminescenza (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences), ed il segnale luminoso emesso dalla reazione viene utilizzato per impressionare i film da autoradiografia. Il segnale ottenuto sulle lastre impressionate rappresenta quindi le bande proteiche riconosciute dall'anticorpo primario specifico.

L'anticorpo utilizzato nell'analisi delle proteine è un anticorpo monoclonale α -XIAP (Stressgen).

Per la rivelazione degli anticorpi primari, è stato utilizzato un anticorpo anti-mouse coniugato ad HRP (Sigma).

RISULTATI

Sindrome autoimmune proliferativa e XIAP.

Nel nostro laboratorio è stato caratterizzato un paziente (paziente A) che presentava una mutazione con azione inibitoria sulla funzione di Xiap. La mutazione costituita da una delezione in posizione 1189 del cDNA crea uno slittamento nella cornice di lettura, portando alla formazione di una proteina tronca a livello del “linker” tra il BIR3 e il RING.

Dal punto mutato tale mutazione aggiunge 17 nuovi aminoacidi responsabili di una degradazione precoce della molecola, i cui livelli sono risultati non valutabili nel paziente emizigote. Viceversa la madre del paziente, portatrice della mutazione in eterozigosi, esprimeva livelli normali della proteina, probabilmente grazie a un fenomeno di compensazione da parte del gene “sano” localizzato sul secondo cromosoma X.

Il paziente A è tuttavia un caso atipico di ALPS/DALD poiché presentava un quadro clinico con linfadenopatia, splenomegalia e autoimmunità, ma presentava una morte cellulare indotta da Fas normale, o addirittura aumentata. Questo dato è in linea con i ridotti livelli di Xiap e suggerisce che in questo paziente il difetto genetico possa indurre il quadro linfoproliferativo agendo a livelli diversi dall’apoptosi. Questa possibilità è anche suggerita da un’altra particolarità della malattia presentata dal paziente A, ovvero lo sviluppo di ricorrenti attacchi febbrili simil-settici.

Il secondo caso analizzato ha permesso di individuare una forma atipica di mRNA per il gene XIAP; tale trascritto è caratterizzato da una delezione di 9 nucleotidi in corrispondenza del dominio BIR3, responsabile del legame con caspasi-9 e del conseguente blocco della via mitocondriale del processo apoptotico.

E’ stato innanzi tutto dimostrato che la forma deleta del mRNA è presente in piccole quantità (inferiori al 5%) sia nei pazienti che nei controlli. L’unica eccezione sembrava essere la paziente B, sua madre e suo fratello, per i quali entrambi i metodi dimostravano la presenza di quantità abnormemente elevate (intorno al 50%) del mRNA deleto.

L’aver confermato che la forma atipica di mRNA di XIAP viene normalmente prodotta, seppure con una bassa frequenza nella popolazione, attraverso un meccanismo di splicing alternativo, mentre nella paziente, nella madre e nel fratello è invece prodotta con una frequenza significativamente più elevata (rispettivamente 57%, 44% e 60%) permette

di ipotizzare che questa elevata produzione in questa paziente abbia basi ereditarie e possa avere un ruolo nello sviluppo della malattia. Il fatto che entrambi questi familiari siano sani suggerisce che la presenza della forma deleta dell'mRNA non sarebbe comunque sufficiente a determinare la comparsa della malattia, la cui manifestazione clinica potrebbe essere condizionata da altri fattori genetici o ambientali. Infine è degno di nota che anche questa paziente, come il paziente A portatore della mutazione, presentava un ricorrente sviluppo di febbri simil-settiche, manifestazione del tutto atipica nell'ALPS.

La mutazione del paziente A e quella della paziente B hanno un aspetto comune: a livello cellulare, le rispettive proteine mutate vengono espresse in modo differente rispetto allo Xiap WT. Nel primo caso i responsabili della degradazione precoce sembrano essere i 17 aa inseriti dal *frameshift* causato dalla mutazione. La variazione nella sequenza amminoacidica introduce probabilmente un segnale di degradazione della proteina alterata. Nel secondo caso la perdita di tre amminoacidi alla fine del BIR3 sembra destabilizzare la proteina mutata: viene infatti persa una Prolina che è molto conservata in tutte le IAP e questo crea probabilmente dei problemi nella struttura terziaria della molecola.

Il possibile legame alla malattia di queste forme di Xiap "labile" sembra confermato dal fatto che entrambi i pazienti presentavano una forma atipica di ALPS, nella quale la tipica sintomatologia autoimmune linfoproliferativa si associava a episodi ricorrenti di febbri simil-settiche, cosa che suggerisce un ruolo del difetto nel controllo nel processo infiammatorio.

Individuazione di un polimorfismo nel gene di XIAP.

L'analisi del DNA genomico di 40 pazienti affetti da sindrome da febbri ricorrenti e da 118 controlli ha permesso di individuare un polimorfismo in posizione c1268A/C che si traduce nel cambiamento amminoacidico Q423P, variando una glutamina in prolina. L'allele c1268A risulta essere associato nel gruppo di pazienti con febbri ricorrenti ($p=0,028$).

Ampliamento della casistica.

Per ampliare la casistica, è stata valutata la distribuzione di tale polimorfismo anche in un gruppo di pazienti con ALPS (88) ed in un gruppo di pazienti con sclerosi multipla (55). L'ampliamento dello studio ha permesso di individuare la significativa distribuzione

del polimorfismo c1268A nei sottogruppi di pazienti femmine nei gruppi con febbri ricorrenti e con sclerosi multipla (Tab. 1), (rispettivamente $p= 0,045$ e $p= 0,009$).

Nei sottogruppi dei maschi di ciascuna popolazione la distribuzione del polimorfismo risulta non raggiungere mai la soglia di significatività. Tale dato suggerisce la necessità di ampliare il numero dei soggetti da analizzare, così da poter stabilire se la differente significatività, rilevata fra i sottogruppi dei maschi e delle femmine, possa essere considerata reale o imputabile ad un difetto di campionamento.

Allele	CTR	%	SM	%	Febbri	%	ALPS	%
A	98	62	66	66	43	80	76	59
C	60	38	34	34	11	20	52	41
Tot	158	100	100	100	54	100	128	100

$p=$ **0,6** **0,028**
0,74

Maschi	CTR	%	SM	%	Febbri	%	ALPS	%
A	51	65	13	59	20	77	27	56
C	27	35	9	41	6	23	21	44
Tot	78	100	22	100	26	100	48	100

$p=$ **0,77** **0,39**
0,4

Femmine	CTR	%	SM	%	Febbri	%	ALPS	%
A	47	59	53	80	23	82	49	61
C	33	41	13	20	5	18	31	39
Tot	80	100	66	100	28	100	80	100

$p=$ **0,009** **0,045**
0,87

Tab.1. Distribuzione del polimorfismo c1268A/C nelle popolazioni esaminate.

Nella parte alta della tabella si nota la distribuzione del polimorfismo c1268A/C nelle popolazioni esaminate. Nelle parti sottostanti la stessa distribuzione differenziando ciascuna popolazione in base al sesso.

Analisi di espressione del mRNA codificante per l'allele polimorfico.

Il passo successivo dello studio è stato quello di verificare, in soggetti di controllo che presentavano il polimorfismo in eterozigosi, se entrambi i polimorfismi venissero espressi in ugual misura. Dai linfociti di tre soggetti di controllo eterozigoti è stato estratto l'RNA totale che è stato poi utilizzato per la sintesi del cDNA. Il cDNA ottenuto è stato successivamente utilizzato come template per una reazione di PCR che ha permesso di amplificare, mediante oligonucleotidi specifici, la porzione di XIAP codificante per il frammento contenente il polimorfismo.

Il frammento ottenuto è stato clonato nel vettore pGEM, quindi trasformato in cellule competenti JM109.

Le colonie cresciute sono state analizzate con PCR specifica per il frammento clonato e quindi sequenziate. L'analisi di 107 colonie totali ha permesso di evidenziare una differente produzione di mRNA codificante per l'allele c1268C: questo infatti risulta essere rappresentato solo nel 19% delle colonie analizzate. E' stata quindi valutata anche l'espressione del mRNA c1268C per ciascun singolo controllo analizzato, ed anche in questo caso è stato confermato il dato ottenuto nell'analisi generale delle colonie (Tab.2).

	CAA	CCA	% su ctr	
Ctr1	25	8	24	
Ctr2	38	2	5	
Ctr3	24	10	29	
			% CCA su tot	19%

Tab.2. Espressione del mRNA del polimorfismo c1268A/C in controlli sani eterozigoti.

La tabella rappresenta il numero di colonie sequenziate per ciascun controllo, la percentuale dei due alleli A/C e la percentuale totale dell'allele C rispetto al totale.

Clonaggio dei due polimorfismi in pEGFP-C2 e trasfezioni transienti in cellule 293T.

La minor espressione del mRNA corrispondente all'allele c1268C potrebbe riscontrarsi anche in una minor espressione della proteina, per questo motivo le due forme polimorfiche sono state amplificate da soggetti di controllo omozigoti per ciascun alleli, e clonate, tramite digestione enzimatica e legazione, nel vettore pEGFP-C2.

I due vettori così ottenuti, pEGFP-XIAP-c1268A e pEGFP-XIAP-c1268C, e il vettore pEGFP-C2 privo di inserto, sono stati utilizzati per trasfettare in transiente la linea embrionale renale umana 293T. Ventiquattro ore dalla trasfezione, le cellule sono state raccolte e lisate.

I lisati ottenuti sono stati sottoposti a SDS-PAGE e trasferite su nitrocellulosa per essere poi analizzati in Western Blot, utilizzando un anticorpo monoclonale anti-GFP.

Il Western Blot riportato in fig. 3 evidenzia come il costrutto dell'allele c1268A venga normalmente espresso dalle cellule trasfettate, al pari della proteina GFP nativa, mentre non si viene evidenziata l'espressione del costrutto contenente l'allele c1268C.

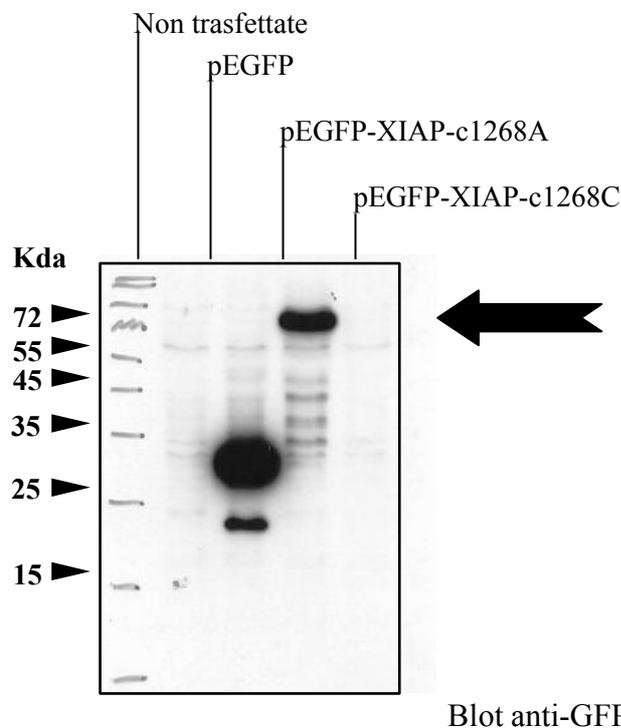


Fig. 3. Western blot sui lisati delle cellule trasfettate con i costrutti pEGFP in cui sono state clonate le due forme polimorfiche c1268A/C.

Il western blot rappresentato è stato colorato utilizzando come anticorpo primario, un anticorpo monoclonale anti-XIAP, e come anticorpo secondario, un anticorpo anti-mouse coniugato con HRP. Per ciascun campione sono stati caricati 150 µg di lisato totale.

Contemporaneamente a questo abbiamo quindi deciso di valutare l'espressione *in vivo* dei costrutti trasfettati nelle cellule 293T, tramite analisi al microscopio a fluorescenza.

I campioni sono stati osservati al microscopio, evidenziando anche in questo caso un'alterata espressione del costrutto contenente l'allele c1268C. Le figure 4, 5 e 6 mostrano le immagini acquisite delle cellule trasfettate rispettivamente con il vettore vuoto pEGFP-C2, con il vettore pEGFP-XIAP-c1268A e pEGFP-XIAP-c1268C. In figura 7 l'ingrandimento 1:3 della regione evidenziata in figura 6.

Mentre le cellule trasfettate con il costrutto pEGFP-XIAP-c1268A risultano avere un livello di espressione della proteina di fusione paragonabile a quello della proteina GFP nativa, le cellule trasfettate con il costrutto pEGFP-XIAP-c1268C presentano un marcato difetto di espressione della proteina clonata, nonché la formazione di aggregati proteici membrano-prossimali in cui si concentra la proteina trasfettata. La formazione di tali complessi potrebbe risultare dall'aggregazione di molecole non funzionali, destinate alla degradazione.

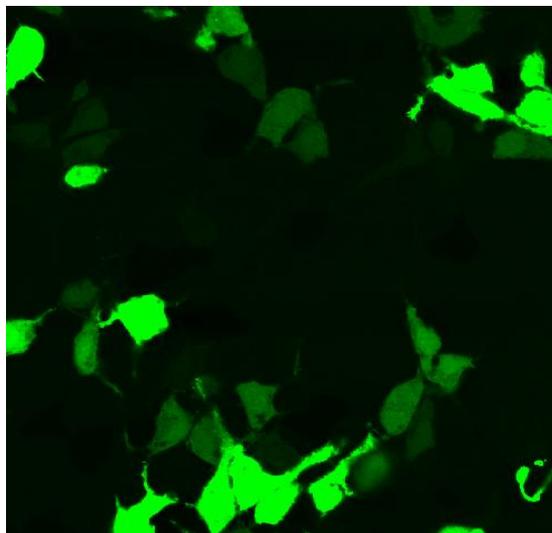


Fig. 4. Cellule 2
La figura mostra

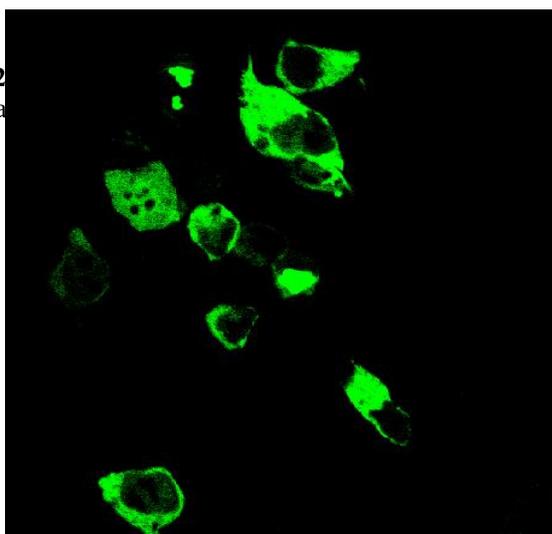


Fig. 3. Cellule 293T trasfettate con pEGFP-XIAP-c1268A.

La figura mostra come il costrutto pEGFP-XIAP-c1268A venga espresso in maniera del tutto paragonabile a quello della GFP *wild-tipe*.

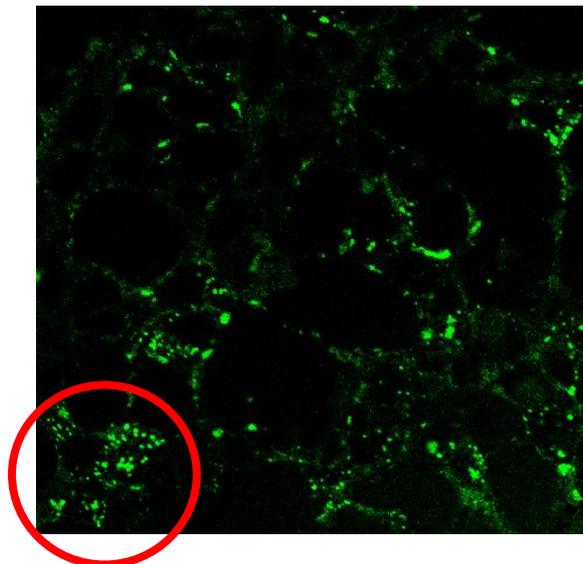


Fig. 6. Cellule 293T trasfettate con pEGFP-XIAP-c1268C.

La figura mostra come il costrutto pEGFP-XIAP-c1268C presenti una marcata alterazione dell'espressione della proteina trasfettata, nonché la sua localizzazione in aggregati membrano-prossimali.

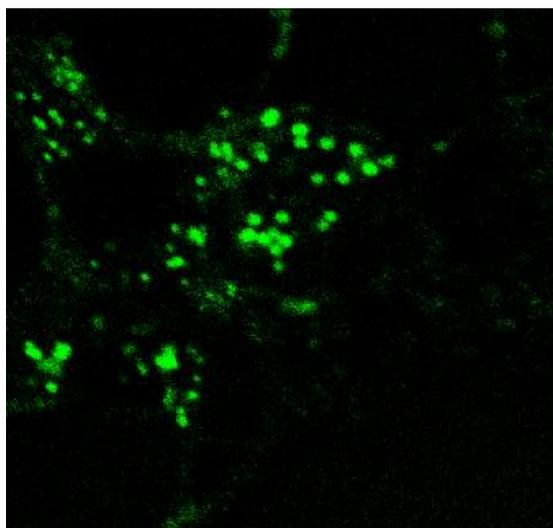


Fig. 7. Cellule 293T trasfettate con pEGFP-XIAP-c1268C. Ingrandimento 1:3 della zona segnata in rosso della figura 6. Dettaglio degli aggregati proteici formati dal costrutto pEGFP-XIAP-c1268C.

Espressione dell'allele c1268C in soggetti di controllo.

Data l'alterata espressione dell'allele c1268C nelle cellule 293T, ci siamo chiesti se questo deficit fosse osservabile anche nelle cellule dei soggetti portatori del polimorfismo.

A tale scopo sono stati analizzati PBMCs purificati da soggetti di controllo che presentano o meno tale polimorfismo. I PBMCs derivati da soggetti maschi di controllo (2 soggetti con l'allele c1268C e 1 con c1268A) e da soggetti femmine (1 soggetto omozigote per l'allele c1268A/C, 2 soggetti eterozigoti c1268A/C ed uno omozigote c1268C/C) sono stati coltivati in terreno contenente 2u/ml di IL-2, ed attivati con PHA (1µg/ml). Da queste colture sono stati prelevati 5×10^6 cellule ai tempi T2, T4, T7, T10 e T15 (per i soggetti femmine sono stati recuperati solo i tempi fino a T7) dall'attivazione; esse sono state lisate e 150 mg di lisato sono stati corsi in SDS-PAGE e trasferiti su nitrocellulosa, quindi analizzati in Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale anti-XIAP.

Come è riportato in Fig. 8, l'analisi dei soggetti maschi ha permesso di individuare una diminuita espressione dei livelli endogeni di XIAP nei soggetti con l'allele c1268C, rispetto al soggetto con l'allele c1268A, confermando il dato ottenuto dalla trasfezione delle cellule 293T.

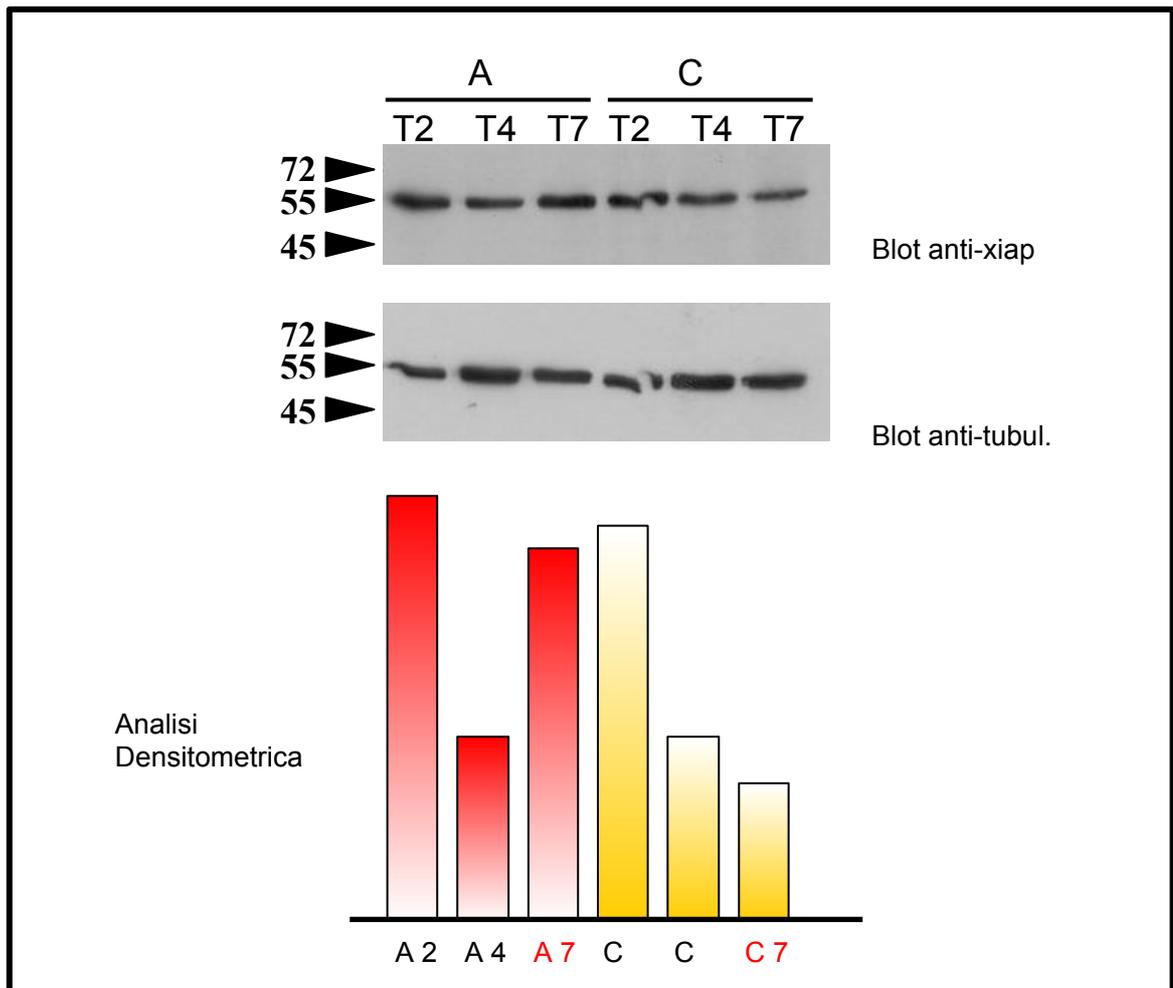


Fig. 8. Time-course di espressione di XIAP in controlli sani maschi. Sono stati analizzati due soggetti portatori dell'allele c1268C (C1 e C2) ed uno dell'allele c1268A (A1). Come anticorpo primario è stato utilizzato un anticorpo anti-XIAP monoclonale, come secondario un anticorpo anti-mouse coniugato con HRP. In basso è riportata la relativa densitometria in unità arbitrarie dei segnali dell'anticorpo anti-Xiap, normalizzati in base ai rispettivi segnali dell'anticorpo anti-tubulina.

L'analisi di espressione condotta su soggetti di controllo femminili (Fig.9) ha permesso di individuare nei primi giorni dopo l'attivazione, una difettiva espressione della proteina nei soggetti portatori almeno di un allele c1268C, rispetto al soggetto omozigote c1268A/A. Questo difetto viene compensato nei giorni successivi di coltura, più precocemente dai soggetti eterozigoti (al T4) e successivamente anche dal soggetto omozigote c1268C/C (T7).

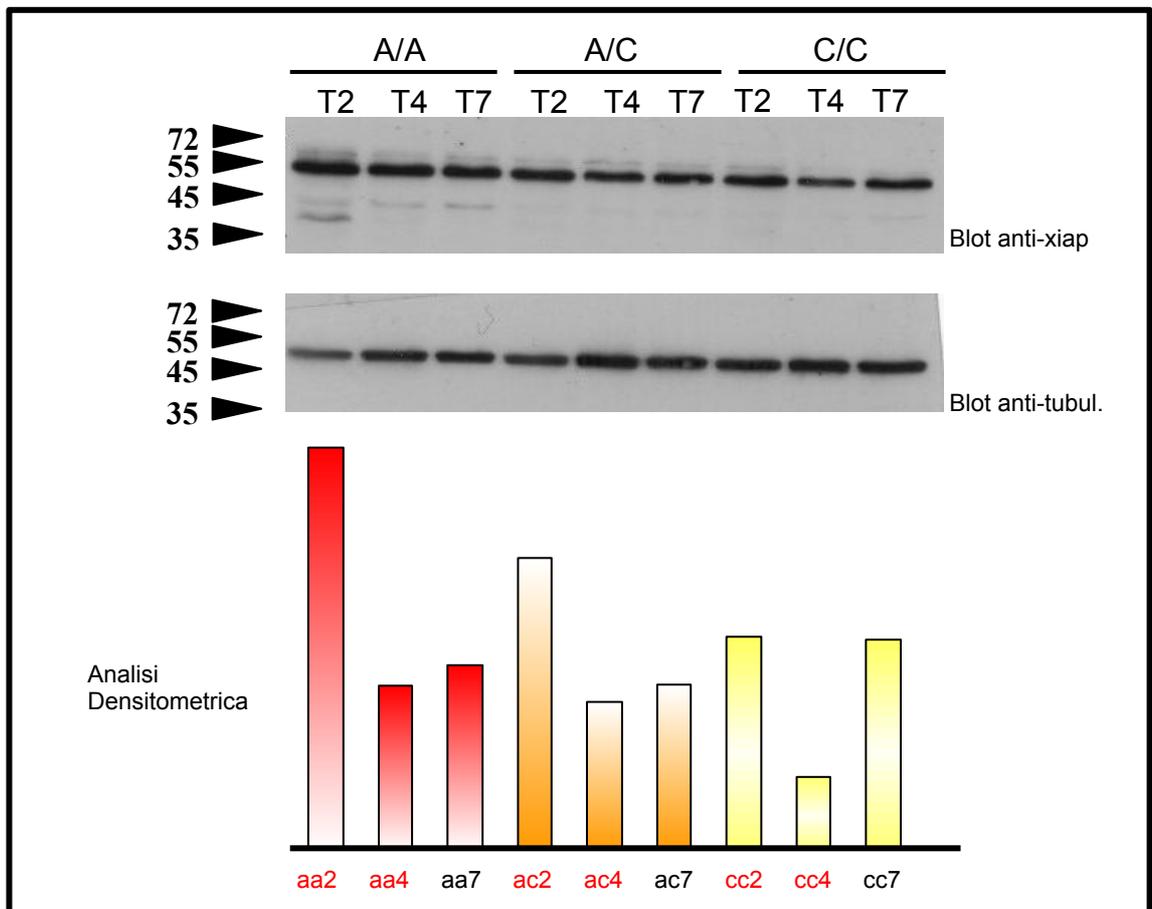
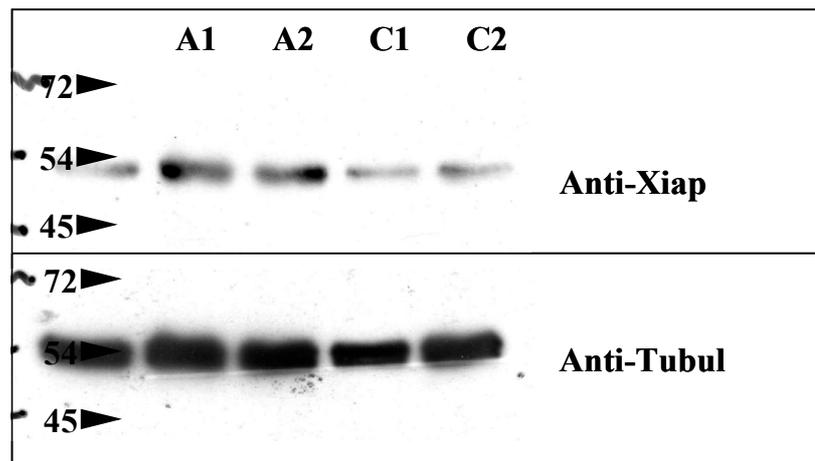


Fig. 9. Time-course di espressione di XIAP in controlli sani femmine. Sono stati analizzati un soggetto omozigote c1268A/A (A/A), due soggetti eterozigoti c1268A/C (C/A1 e C/A2) ed uno omozigote c1268C/C (C/C). Come anticorpo primario è stato utilizzato un anticorpo anti-XIAP monoclonale, come secondario un anticorpo anti-mouse coniugato con HRP. In basso è riportata la relativa densitometria in unità arbitrarie dei segnali dell'anticorpo anti-Xiap, normalizzati in base ai rispettivi segnali dell'anticorpo anti-tubulina.

L'analisi dell'espressione delle due varianti della proteina è stata ampliata aumentando il numero di soggetti sani maschi presi in esame. Sono stati analizzati sei soggetti portatori di ciascuna delle due varianti, i cui linfociti sono stati recuperati e lisati al giorno 7 di coltura, giorno in cui risultava più marcata la differenza fra i livelli di espressione delle due varianti proteiche. Tale analisi ha confermato la differenza di espressione delle due forme e, tale differenza, risulta essere significativa con un valore $p=0,009$ (Fig.10).

(A)



(B)

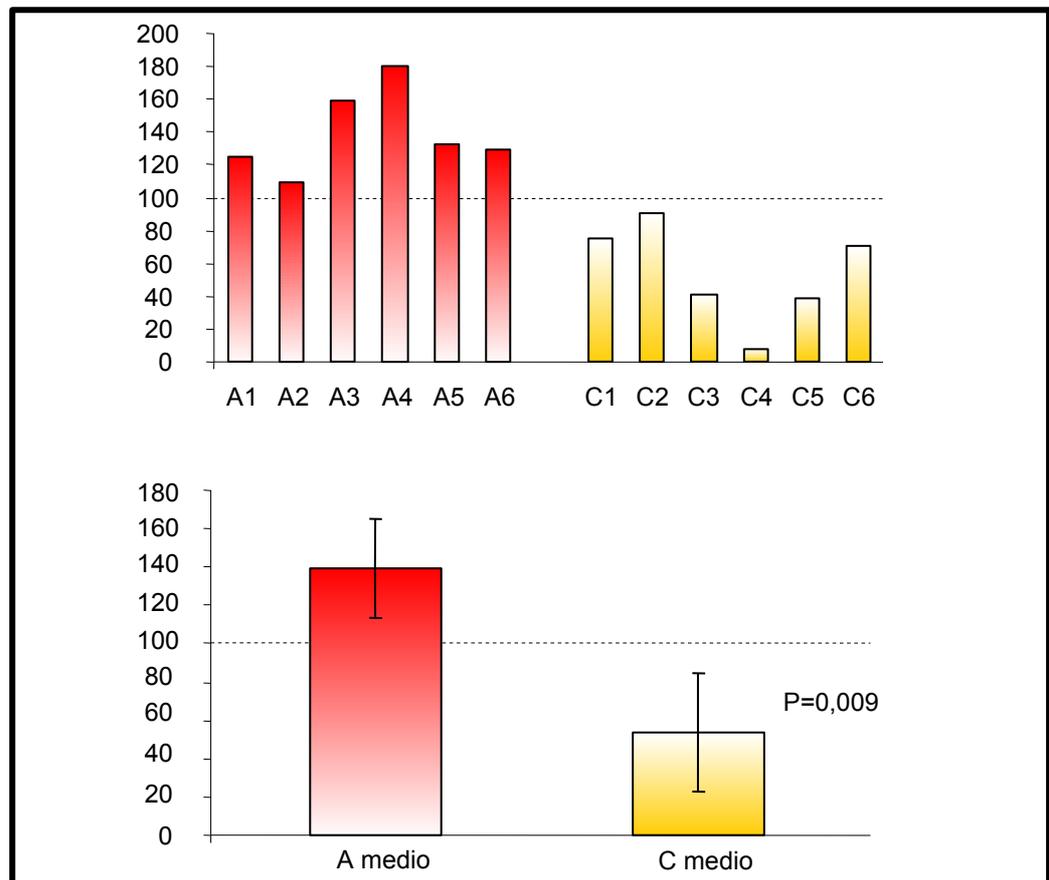
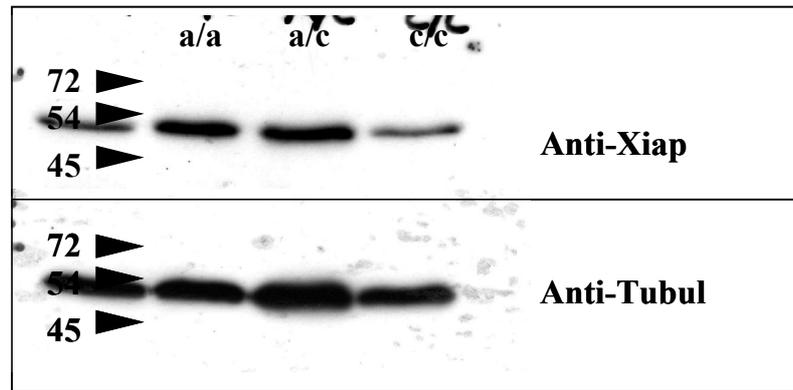


Fig. 10. Analisi dell'espressione delle due varianti di Xiap in maschi tramite Western Blot. In figura è riportato un Western Blot esemplificativo di tutti quelli ottenuti (A), mentre sotto viene riportata l'analisi totale delle densitometrie calcolate in ciascun esperimento (B), nonché il valore medio delle stesse, deviazione standard e valore p.

L'analisi dell'espressione è stata inoltre ampliata ai soggetti femminili di controllo. Benché sia possibile riscontrare una marcata differenza di espressione, soprattutto fra i soggetti omozigoti per la variante c1268A, e quelli eterozigoti, in confronto ai soggetti omozigoti per la variante c1268C, tuttavia lo scarso numero di soggetti analizzati, non permette di poter stabilire se tale differenza risulta essere significativa (Fig.11).

(A)



(B)

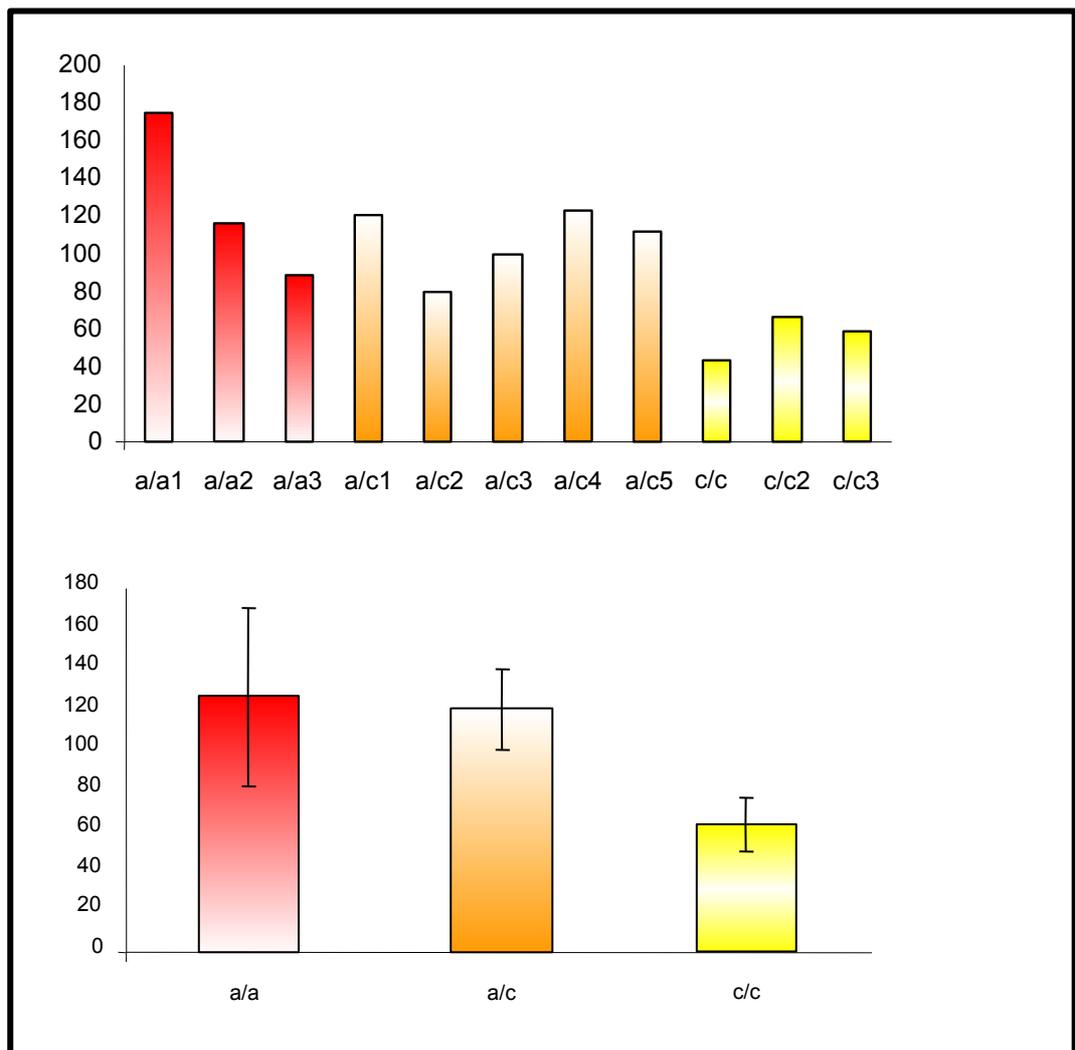


Fig. 11. Analisi dell'espressione delle due varianti di Xiap in femmine tramite Western Blot. In figura è riportato un Western Blot esemplificativo di tutti quelli ottenuti (A), mentre sotto viene riportata l'analisi totale delle densitometrie calcolate in ciascun esperimento (B), nonché il valore medio delle stesse.

Attività della caspasi-9 nei soggetti di controllo maschi analizzati.

Una volta appurato che la differenza di espressione fra maschi portatori delle due varianti, risulta essere significativa, si è voluto verificare se, tale differenza, può influire inoltre sulla funzionalità della proteina stessa. Per verificare tale ipotesi i linfociti dei soggetti in analisi sono stati stimolati con etoposide, in grado di attivare la via intrinseca dell'apoptosi, per poter valutare l'attivazione della caspasi-9. Essendo la caspasi-9 uno dei diretti substrati dell'inibizione dovuta a Xiap, a più alti livelli dello stesso inibitore dovrebbero corrispondere più bassi livelli di attività del substrato. In figura 12 è mostrato come tale ipotesi sembra essere comprovata; benché i soggetti analizzati non siano sufficienti per rendere il dato statisticamente significativo, i soggetti portatori della variante c1268A che garantisce alti livelli di Xiap, mostrano una ridotta attività della caspasi-9, rispetto ai soggetti portatori dell'altra variante.

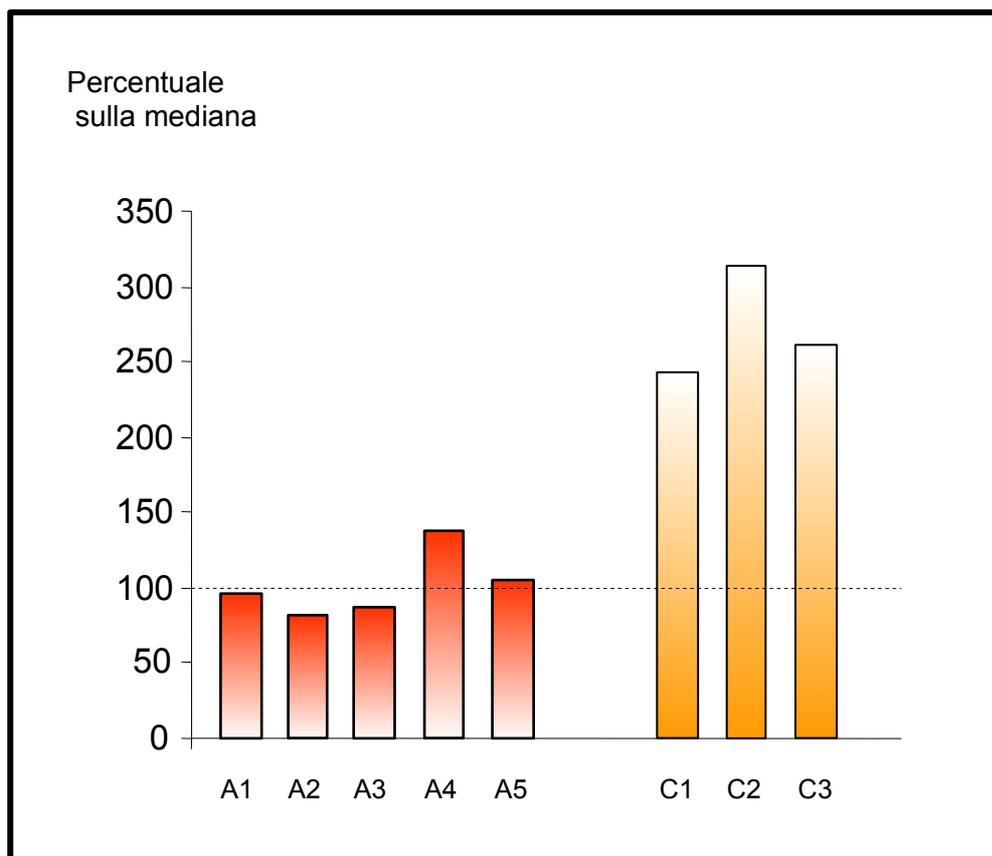


Fig. 12. Analisi dell'attività della caspasi-9 su soggetti di controllo maschi. In figura sono riportate le percentuali di attivazione della caspasi-9 in riferimento ai campioni non stimolati. La linea tratteggiata rappresenta la mediana dei valori, posta uguale a 100.

Le varianti di Xiap influenzano l'attivazione macrofagica.

Poiché in letteratura è riportato come, durante il differenziamento macrofagico, l'espressione di Xiap viene up-regolata, e, considerato che le sindromi da febbre ricorrente hanno una forte componente infiammatoria, il progetto si è concentrato sulla componente macrofagica. Al fine di stabilire se la differente espressione di Xiap nei soggetti maschi portatori di una o dell'altra variante, possa in qualche modo influire l'attivazione dei macrofagi, è stata valutata la capacità dei macrofagi appartenenti ai soggetti in esame di stimolare linfociti allogenici.

In figura 13 è riportato il grafico di tutti gli esperimenti di proliferazione a seguito di stimolo alloigenico allestiti finora. E' possibile notare come sembra esserci una differenza, seppur non ancora statisticamente significativa, fra i campioni di soggetti portatori delle differenti varianti.

I macrofagi provenienti da soggetti portatori dello Xiap c1268A, che hanno più alta espressione della proteina, inducono maggior proliferazione in linfociti alloigenici, rispetto ai macrofagi di soggetti portatori della variante c1268C, quando attivati utilizzando lipopolisaccaride batterico come stimolo. Questo dato, se confermato dopo l'ampliamento della casistica, suggerirebbe quindi che i differenti livelli di espressione di Xiap possono influenzare l'attivazione macrofagica, il che potrebbe spiegare in quale modo la variante che garantisce più alti livelli della proteina, risulta essere associata alle sindromi da febbre ricorrente.

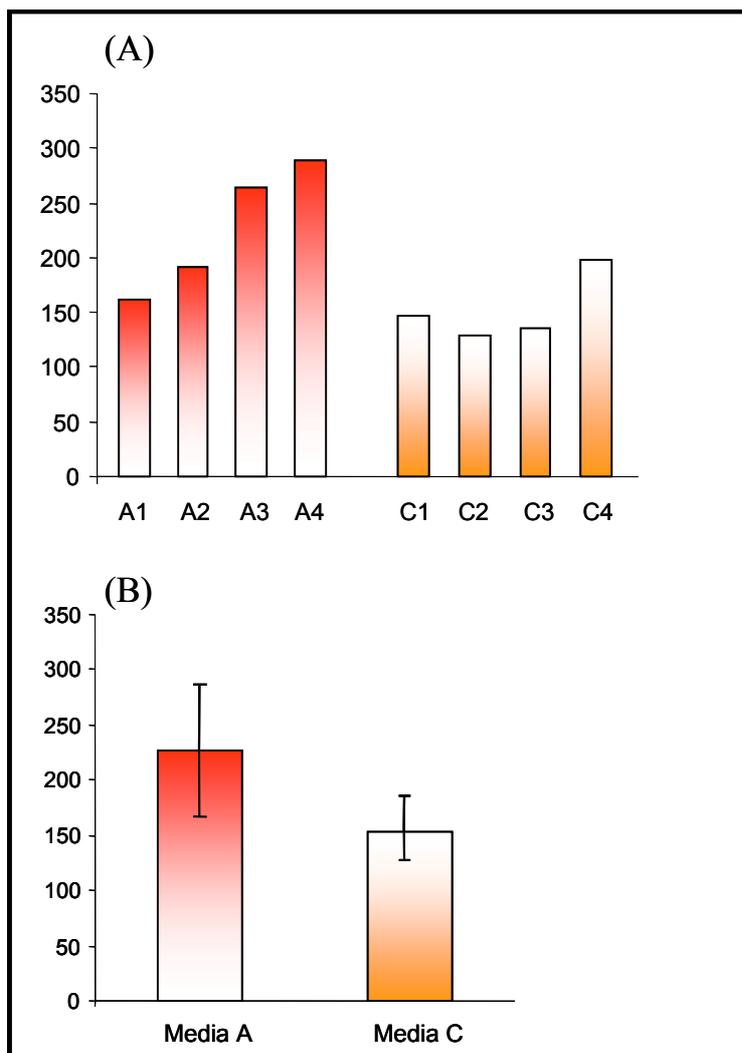


Fig. 13. Proliferazione di linfociti allo genici in seguito a stimolo dei macrofagi dei soggetti analizzati. In figura sono riportate le percentuali di proliferazione dei campioni macrofagici attivati con LPS, rispetto ai corrispettivi valori ottenuti in assenza di attivazione (A); in basso è riportato il valore medio fra i vari esperimenti con le deviazioni standard (B).

Prospettive future del progetto.

Per procedere con il progetto verranno svolti esperimenti indirizzati ad ampliare tutte le casistiche analizzate finora, in modo da rendere eventuali differenze, statisticamente significative. Verranno analizzati con gli stessi criteri utilizzati per i soggetti di controllo maschi, anche i controlli femmine.

Al fine di poter meglio correlare i livelli proteici di Xiap con un effettivo ruolo nelle sindromi da febbre ricorrente, verrà inoltre valutata la possibilità che i differenti livelli di Xiap possano garantire un differente livello di sopravvivenza dei macrofagi appartenenti a soggetti portatori delle differenti varianti.

BIBLIOGRAFIA

1. Goldsby R.A., Kindt T.J. and Osborne B.A. *Kuby Immunologia*. 2nda Edizione 2000.
2. Wu J., Zhou T., Zhang J. et al.: Correction of accelerated autoimmune disease by bearly replacement of the mutated *lpr* gene with the normal Fas apoptosis gene in the T cells of transgenic MLR-*lpr/lpr* mice. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91, 2344-2348, 1994.
3. Fisher GH, Rosemberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ and Puck JM. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome., *Cell.*, 81:935-946, 1995.
4. Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome., *Ann Intern Med.*, 130(7): 591-601, 1999.
5. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science.*;268:1347-1349, 1995.
6. Drappa J., Vaishnaw A.K., Sullivan K.E. et al.: Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Engl J Med* 335, 1643-1649, 1996.

7. Bettinardi A., Brugnoli D., Quiros-Roldan E. et al.: LD. Missense mutations in the Fas gene resulting in autoimmune lymphoproliferative syndrome: a molecular and immunological analysis. *Blood* 89, 902-909, 1997.
8. Fleisher TA, Puck JM, Strober W, Dale JK, Lenardo MJ, Siegel RM, Straus SE, Bleesing JJ. The autoimmune lymphoproliferative syndrome. A disorder of human lymphocyte apoptosis. *Clin Rev Allergy Immunol.*, 20(1):109-20, 2001.
9. Jackson CE, Puck JM. Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis. *Curr Opin Pediatr.*, 11(6):521-527, 1999.
10. Adachi M., Suematsu S., Kondo T. et al.: Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in the peripheral lymphoid organs and liver. *Nature Genet.* 11, 294-300, 1995.
11. Choi Y, Ramnath VR, Eaton AS, Chen A, Simon-Stoos KL, Kleiner DE, Erikson J, Puck JM. Expression in transgenic mice of dominant interfering Fas mutations: a model for human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clin Immunol.*, 93(1):34-45, 1999.
12. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science.*;267:1449-1456, 1995.
13. O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege. *Immunol Today.* 20(1):46-52, 1999
14. Peter M.E., Scaffidi C., Medema J.P., Kischkel F.C. and Krammer P.H. The death receptors in apoptosis: biology and mechanisms. *Results and Problems in Cellule Differentiation.* Vol. 23 S. Kumar. Ed. Springer-Verlag, Heidelberg. p. 25, 1999.
15. Pan G, Bauer J.H., Haridas V., Wang D., Liu D., Yu G., Vincenz C., Aggarwal B.B., Ni J., and Dixit S. Identification and functional characterisation of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett.* 431:351, 1998.
16. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien, RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science.*, 288(5475):2354-2357, 2000.
17. Griffith T.S., Brunner T., Fletcher S.M. et al.: Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270, 1189-1192, 1995.
18. Gomez-Angelats M, Cidlowski JA. Protein Kinase C Regulates FADD Recruitment and Death-inducing Signaling Complex Formation in Fas/CD95-induced Apoptosis. *J Biol Chem.* 276(48):44944-44952, 2001.

19. J.P. Medema, C. Scaffidi, F.C. Kischkel, A. Shevchenko, M. Mann, P. H. Krammer, M. E. Peter, FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC), *The EMBO Journal* 16 n. 10: 2794-2804, 1997.
20. M. Los, C. Stroh, R. U. Janiche, I. H. Engels, K. Schulze-Osthoff Caspases: more than just killers? *Trends in Immunology* Vol.22 No.1, 2001.
21. Hofmann TG, Moller A, Hehner SP, Welsch D, Droge W, Schmitz ML. CD95-induced JNK activation signals are transmitted by the death-inducing signaling complex (DISC), but not by Daxx. *Int J Cancer*. 93(2):185-191, 2001.
22. Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*, 276(23), 2001.
23. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 81(4):505-512, 1995.
24. S. Desagher, J.C. Martinou, Mitochondria as the central control point of apoptosis, *Trend in Cell Biology* (vol. 10), 2001.
25. De Maria R., Lenti L., Malisan F. et al.: Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science* 277, 1652-1655, 1997.
26. De Maria R, Rippo MR, Schuchman EH et al.: Acidic sphingomyelinase (ASM) is necessary for fas-induced GD3 ganglioside accumulation and efficient apoptosis of lymphoid cells. *J Exp Med* 187, 897-902, 1998.
27. Hu Y., Benedict M.A., Wu D. et al.: G. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4386-4391, 1998
28. Li P., Nijhawan D., Budihardjo I. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489, 1997.
29. C. Scaffidi, S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tommaselli, K.M. Debatin, P.H. Krammer, M.E. Peter, Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways, *The EMBO Journal* 17 n.6: 1675-1687, 1998.
30. Chiocchetti A., Dianzani U. Role of Fas defects in autoimmunity. *Res. Adv. In Blood*, 2001.
31. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. Aug 1;13(15):1899-911, 1999.

32. Pan G., O'Rourke K., Dixit V.M.: Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 273, 5841-5845, 1998.
33. Cheng E.H., Kirsch D.G., Clem R.J. et al.: Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278, 1966-1968, 1997.
34. Deveraux Q.L., Roy N., Stennicke H.R. et al.: IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 17, 2215-2223, 1998.
35. Seshagiri S., Miller L.K.: Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sf-caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13606-13611, 1997.
36. Roy N., Deveraux Q.L., Takahashi R. et al. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 16, 6914-6925, 1997.
37. Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S. et al. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388, 300-304, 1997.
38. Ambrosini G., Adida C., Altieri D.C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3, 917-921, 1997.
39. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*;102(1) :33-42, 2000.
40. Verhagen A.M et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*;102:43-53, 2000.
41. Wu G, Chai J, Suber TL, WU JW, Du C, Wang X, Shi Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO *Nature.*; 408(6815):1008-1012, 2000.
42. Lagace M. Xuan JY. Young SS. McRoberts C. Maier J. Rajcan-Separovic E. Korneluk RG. Genomic organization of the X-linked inhibitors of apoptosis and identification of a novel testis-specific transcript. *Genomics* 77: 181-188, 2001.
43. Duckett CS. Nava VE. Gedrich RW. Clem RJ. Van Dongen JL. Gilfillan MC. Shiels H. Hardwick JM. Thompson CB. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J* 15: 2685-2694, 1996.
44. Farahani R, Fong WG, Korneluk RG, MacKenzie AE. Genomic organization and primary characterization of miap-3: the murine homologue of human X-linked IAP. *Genomics*. 1997 Jun 15;42(3):514-8.
45. Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG. Suppression of apoptosis in

- mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*. 1996 Jan 25;379(6563):349-53.
46. Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salveen GS, and Reed JC. Cleavage of Human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* 18: 5242-5251, 1999.
 47. Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, and Reed JC. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 273: 7787-7790, 1998.
 48. Johnson DE, Gastman BR, Wieckowski E, Wang GQ, Amoscato A, Delach SM, Rabinowich H. Inhibitor of apoptosis protein hILP undergoes caspase-mediated cleavage during T lymphocyte apoptosis. *Cancer Res*. 2000 Apr 1;60(7):1818-23.
 49. Chai J. et al. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 104: 769-780, 2001.
 50. Riedl SJ. et al. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104: 791-800, 2001.
 51. Huang Y. et al. Structural basis of caspase inhibition by XIAP. Differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 104 : 781-790, 2001.
 52. Sun C, Cai M, Gunasekera AH, Meadows RP, Wang H, Chen J, Zhang H, Wu W, Xu N, Ng SC, Fesik SW. NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature*. 1999 Oct 21;401(6755):818-22.
 53. Bratton SB, Lewis J, Butterworth M, Duckett CS, Cohen GM. XIAP inhibition of caspase-3 preserves its association with the Apaf-1 apoptosome and prevents CD95- and Bax-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. 2002 Sep;9(9):881-92.
 54. Datta R, Oki E, Endo K, Biedermann V, Ren J, and Kufe D. XIAP regulates DNA damage-induced apoptosis downstream of caspase-9 cleavage. *J Biol Chem* 275: 31733-31738, 2000.
 55. Hinds MG, Norton RS, Vaux DL, Day CL. Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat Struct Biol*. 1999 Jul;6(7):648-51.
 56. Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science*. 2000 May 5;288(5467):874-7.
 57. Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and

- enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17;98(15):8662-7. Epub 2001 Jul 10.
58. Holcik M, Korneluk R. XIAP, the guardian angel. *Mol Cell Biol* 2: 550-556, 2001.
 59. MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB, Cohen GM. Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem*. 2002 Sep 27;277(39):36611-6. Epub 2002 Jul 16.
 60. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000 Jul 7;102(1):33-42.
 61. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 2000 Jul 7;102(1):43-53
 62. Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem*. 2002 Jan 4;277(1):432-8. Epub 2001 Oct 17.
 63. Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem*. 2002 Jan 4;277(1):439-44. Epub 2001 Oct 15.
 64. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*. 2001 Sep;8(3):613-21.
 65. Saelens X, Matthijssens F, Schotte P, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. Caspases are not localized in mitochondria during life or death. *Cell Death Differ*. 2002 Nov;9(11):1207-11.
 66. Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, Meadows RP, Betz SF, Oost T, Herrmann J, Wu JC, Fesik SW. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature*. 2000 Dec 21-28;408(6815):1004-8.
 67. Lin H, Chen C, Chen B.M. Resistance of bone marrow-derived macrophages to apoptosis is associated with the expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in primary culture of bone marrow cells. *Biochem*. 2001, 353 – 299/306.

68. Miranda M.B, Dyer K.F, Grandis J.R, Johnson D.E. Differential activation of apoptosis regulatory pathways during monocytic vs granulocytic differentiation: a requirement for Bcl-X_L and XIAP in the prolonged survival of monocytic cells. *Leukemia* 2003, 17- 390/400
69. Dod C, Cuisset L, Delpech M, Grateau G. TNFRSF1A-associated periodic syndrome (TRAPS), Muckle-Wells (MWS) and renal amyloidosis.
70. Centola M, Aksentijevich I, Kastner D.L. The hereditary periodic fever syndrome: molecular analysis of a new family of inflammatory diseases. *Human Molecular Genetics*.1998 Vol. 7, No 10 review: 1581-88.
71. Houten S.M, Frenkel J, Rijkers G.T, Wanders R, Kuis W, Waterham H.R. Temperature dependence of mutant mevalonate kinase activity as a pathogenic factor in Hyper-IgD and periodic fever syndrome. . *Human Molecular Genetics*.2002 Vol. 11, No 25: 3115-24.
72. Frenkel J, et al. Clinical and molecular variability in childhood periodic fever with hyperimmunoglobulinaemia D. *Rheumatology* 2001;40:579-584.

PRIMO ANNO

Corsi/Congressi seguiti:

- “Corso di Elettroforesi Bidimensionale”. 28/29 settembre 2004. Palazzo LITA, Istituto Tecnologie Biomediche Avanzate (ITBA), Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Fratelli Cervi 93, Segrate (MI).

Seminari seguiti dal 1-4-04

- 3-5-04 “Genetic bases of the ALPS subtypes”, Frederic Rieux-Laucat;
- 11-5-04 “Seminario conclusivo del corso di bioetica”, Università degli Studi di Milano;
- 20-5-04 “Le artriti croniche del bambino”, Alberto Martino;
- 28-5-04 “Il reticolo endoplasmatico: un labirinto metabolico”, Angiolo Benedetti;
- 11-6-04 “Virus e malattie autoimmuni”, Antonio Puccetti;
- 14-6-04 “Biomedical discovery using microarray: principles, prospects and problems”, David Murphy;
- 14-6-04 “Pitfalls of genetic studies in liver diseases”, Christopher Day;
- 15-6-04 “Functional genomics of hypothalamic homeostatic plasticity”, David Murphy.

SECONDO ANNO

Corsi/Congressi seguiti:

- XXVII National Congress S.I.P. 20-23 Febbraio 2005. MODENA. *Le basi molecolari delle malattie.*
- Corso di Statistica. Coordinatore Prof. Magnani;
- Corso di Lingua Inglese. Prof. Colin Irving-bell

Seminari seguiti.

- 2-12-04 “Repertaxin, un nuovo inibitore di IL-8: risultati preclinici e identificazione del meccanismo d’azione”, Riccardo Bertini;
- 11-3-05 “Proteomica dell’epitelio intestinale”, Margherita Ruoppolo;
- 21-3-05 “Sclerosi multipla: ricerca di geni di suscettibilità nella popolazione finlandese”, Rosanna Asselta;
- 23-3-05 “Le cellule dendritiche, un giocatore chiave nella risposta immunitaria: quali e quanti tipi?”, Stefania Nicola;
- 6-4-05 “Toward regulation of gene expression by chromatin modification: some biomedical model”, Gerardo Lopez-Rodas;
- 30-5-05 “Il dolore articolare: un problema chimico o biochimico?”, Giampiero Pescarmona;
- 1-6-05 “Geni e trapianti”, Antonio Amoroso;
- 10-6-05 “Seminario di proteomica – 2Delettrophoresis, from sample to DIGE application”, Amersham Biosciences;
- 17-6-05 “La tossina della pertosse ed il suo B-oligomero: nuovi farmaci immunostimolanti e anti-HIV”, Guido Poli;
- 15-7-05 “Meccanismi molecolari del Parkinson disease”, Stefano Gustincich;
- 12-9-05 “Caratteristiche e potenzialità delle cellule isolate dalle membrane fetali umane: amnion e corion”, Ornella Parolini

Pubblicazioni.

- Comi C, Gaviali P, Leone M, Ferretti M, Castelli L, Mesturini R, Ubezio G, Chiocchetti A, Osio M, Muscia F, Bogliun G, Corso G, Gavazzi A, Mariani C, Cantello R, Monaco F, Dianzani U. Fas-mediated cell apoptosis is impaired in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.

Peripheral nervous system – 2006 Mar;11(1): 53-60

TERZO ANNO

Corsi/Congressi seguiti:

- XXVI European Congress of Immunology. 6-9 Settembre 2006. PARIGI. *First Joint meeting of European National Societies of Immunology.*

Seminari seguiti.

- 18-11-05 “Cardia potassium channel regulation by accessori subunits”, Diego Cotella;
- 23-11-05 “HCV-related steatosis: pathogenic mechanism and clinical applications”, Luigi Adinolfi;
- 25-11-05 “Mechanism of transcriptional regulation and diseases”, Robert Tijan;
- 19-1-06 “Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation”, Maria Grano;
- 13-2-06 “New perspectives in metabotropic glutamate receptors”, Ferdinando Nicoletti;
- 15-2-06 “Anticorpi ricombinanti: un potente tool biotecnologico”, Daniele Sblattero;
- 13-3-06 “Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell'emofilia”, Atonia Follenzi;
- 20-3-06 “The natural course of preclinical type 1 diabetes”, Mikael Knip;
- 6-4-06 “Aspetti immunologici e terapeutici della “hairy cell leucemia”, Francesco Forconi;
- 4-5-06 “Il mesotelioma: un modello di terapia traslazionale”, Luciano Mutti;
- 18-5-06 “L'epatite autoimmune”, Marco Lenzi;

- 30-5-06 “Sperm mediated gene transfer: storia e applicazioni”, Maria Luisa Lavitrano;
- 27-6-06 “Osteointegrazione e superfici implantari” Lia Rimondini;
- 5-7-06 “DNA and protein array in infection diseases: from basic research to vaccine design”, Renata Grifantini;

Pubblicazioni.

- Clementi R, Chiocchetti A, Cappellano G, Cerutti E, Ferretti M, Orilieri E, Dianzani I, Ferrarini M, Bregni M, Danesino C, Bozzi V, Putti MC, Cerutti F, Cometa A, Locatelli F, Maccario R, Ramenghi U, Dianzani U. Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function.
Blood 2006, May 23 [Epub. Ahead of print]
- Mesturini R, Nicola S, Chiocchetti A, Seren-Bernardone I, Castelli L, Bensi T, Ferretti M, Comi C, Dong C, Rojo J.M, Yagi J, Dianzani U. ICOS cooperates with CD28, IL-2, and INF- γ and modulates activation of human naive CD4⁺ T cells.
European Journal of Immunology 2006, in press