

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



**Dottorato di Ricerca  
in  
Medicina Molecolare  
*XXI ciclo***

**Relazione II° anno**

**TITOLO:**

**CO-TRASMISSIONE DI MUTAZIONI NEI GENI DI FAS E  
CASPASI-10 NELLA SINDROME AUTOIMMUNE  
LINFOPROLIFERATIVA (ALPS)**

Candidata: ELISA CERUTTI

*Tutor: Prof. Umberto Dianzani*

# INTRODUZIONE

## **1-APOPTOSI**

Nel corso della vita degli organismi pluricellulari si verifica un continuo rimaneggiamento cellulare volto allo sviluppo dell'organismo adulto, al suo adeguamento alle diverse condizioni e al rimpiazzo delle cellule danneggiate o senescenti. Questo processo prevede l'eliminazione delle cellule indesiderate o in eccesso attraverso l'induzione di un programma di suicidio cellulare detto morte cellulare programmata (MCP) o apoptosi. Il termine deriva dal greco apo-toe-sis riferito alla caduta autunnale delle foglie e voleva sottolineare una forma di morte utile per la sopravvivenza dell'ospite. Nel corso del processo apoptotico la cellula riduce notevolmente il suo volume, la membrana assume un aspetto vescicoloso (zeiosi), il nucleo si condensa e si frammenta. Successivamente la cellula produce i corpi apoptotici circondati da membrana plasmatica, contenenti frammenti di cromatina. La frammentazione della cromatina avviene per opera di endonucleasi che tagliano il DNA al livello degli spazi inter-nucleosomali. Poiché i nucleosomi sono regolarmente distribuiti ogni 180-200 paia di basi, nel corso dell'apoptosi si producono frammenti di DNA multipli di 200 paia di basi, che producono un quadro caratteristico "a scala" (ladder) quando il DNA estratto dalla cellula apoptotica viene separato per elettroforesi. La morte per apoptosi è una morte "pulita": nel corso del processo la cellula esprime molecole, quali carboidrati modificati, ligandi integrinici e fosfatidilserina, che vengono riconosciute da appositi recettori espressi dai macrofagi tissutali, i quali fagocitano la cellula o i suoi frammenti prima che venga perduta l'integrità della membrana. Viene così impedito che la cellula morente rilasci nel tessuto molecole che potrebbero avere azione tossica e proinfiammatoria sul tessuto circostante, quali proteasi e altri enzimi litici, proteine cationiche e molecole con azione ossidante, come avviene in caso di necrosi (Guo et al. 1999; Wyllie et al. 1980; Afford et al. 2000; Vaux et al. 1994; Raff et al. 1992; Hengartner 2000).

L'apoptosi può essere indotta attraverso due vie principali: la via estrinseca innescata da specifici recettori di morte espressi sulla membrana cellulare e la via intrinseca, che agisce a livello del mitocondrio.

I recettori di morte (*Death Receptors*- DR) trasmettono segnali apoptotici grazie al legame con uno specifico ligando (Ashkenazi et al. 1998). Essi rappresentano un

sottogruppo appartenente alla famiglia del *Tumor Necrosis Factor Receptor* (TNF-R) (Baker et al. 1998), composta, fra gli altri, da TNF-R1 (anche chiamato p55, CD120a), TNF-R2 (p75, CD120b), Fas (CD95, Apo-1), DR3, DR4 (TRAIL-R1) e DR5 (TRAIL-R2) (Ashkenazi et al. 1998). I ligandi che attivano questi recettori sono molecole strutturalmente correlate e presentano regioni di omologia con il TNF- $\alpha$  (Ledgerwood et al. 1999; Nagata et al. 1999; Pinkosky et al. 1999; Griffith et al. 1998).

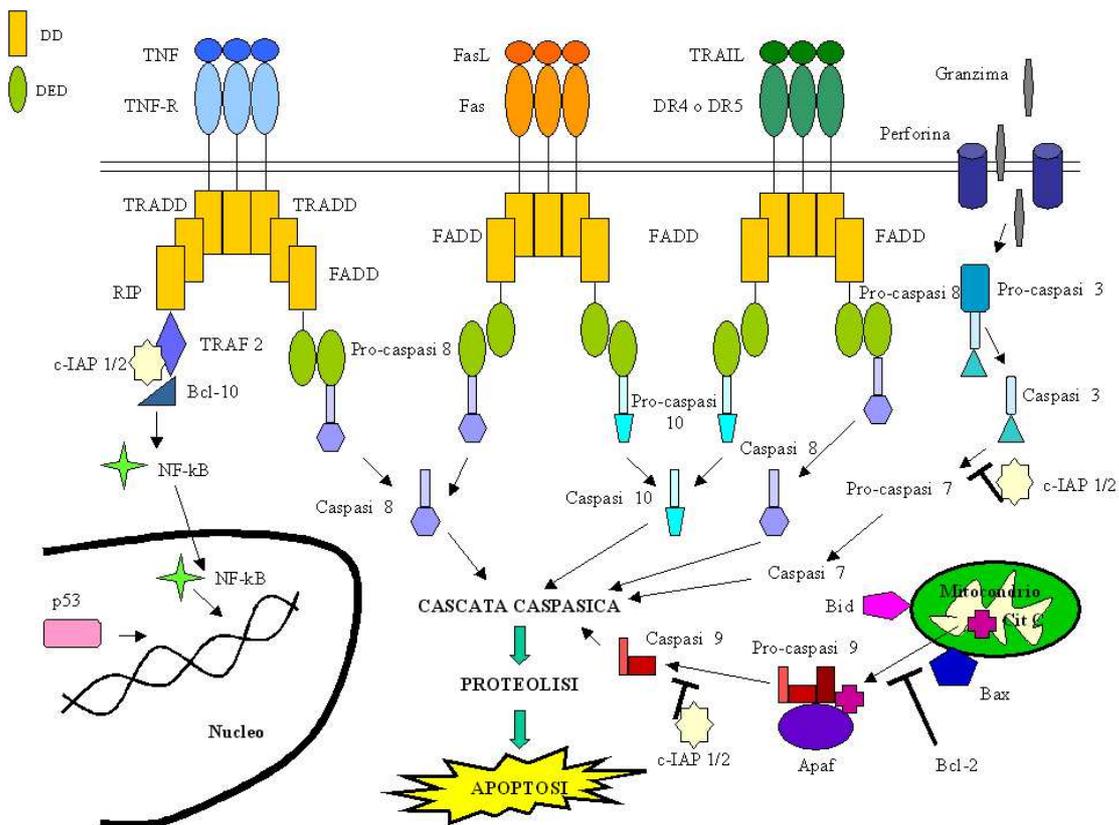
Il DR meglio caratterizzato è Fas. Esso è una glicoproteina transmembrana di 45-48 kD di tipo I espresso dalla maggior parte dei tessuti ed in modo particolare nei linfociti attivati (Nagata 1995, 1997; Baker et al. 1998).

L'interazione di Fas, assemblato in forma trimerica, con un trimero di FasL innesca una cascata di eventi molecolari che portano alla morte apoptotica della cellula (Siegel et al. 2000). In particolare Fas lega la molecola adattatrice FADD che, interagendo con pro-caspasi-8, porta alla formazione del cosiddetto *Death-Inducing Signaling Complex* (DISC) (Griffith et al. 1995; Gomez-Angelats et al. 2001; Medema et al. 1997; Los et al. 2001; Hofmann et al. 2001; Krueger et al. 2001). Le caspasi sono proteasi cisteina-dipendenti che proteolizzano il loro substrato tagliando dopo uno specifico residuo di acido aspartico. Queste proteine risiedono nel citoplasma in forma inattiva e, dopo reclutamento mediato dal recettore, si attivano in seguito ad un taglio proteolitico. La cascata delle caspasi attiva numerosi effettori che alla fine conducono alla morte cellulare (Thornberry et al. 1998; Kumar et al. 1999; Slee et al. 1999). L'attivazione delle caspasi-8 e -10 iniziatrici porta alla successiva attivazione delle caspasi "esecutrici" -3, -7, -6, che realizzano il programma apoptotico mediante scissione diretta di diverse proteine vitali per la cellula e mediante l'attivazione di processi trascrizionali all'interno del nucleo.

Una seconda via apoptotica coinvolge invece i mitocondri e viene definita intrinseca. Una molecola chiave nella via intrinseca è il *citocromo c*. Esso fuoriesce dal mitocondrio in seguito alla depolarizzazione della membrana mitocondriale. Nel citoplasma si lega alla molecola adattatrice Apaf-1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor-1*) (Green et al. 1998; Bossy-Wetzel et al. 1999; Kroemer et al. 2000) che lega a sua volta la pro-caspasi-9, portando alla formazione di un complesso detto *apoptosoma* che provoca l'attivazione della caspasi-9 (Desagher et al. 2001; De Maria et al. 1997, 1998; Hu et al. 1998; Li et al. 1997)

Anche l'attivazione della caspasi-8 può indurre la via intrinseca attraverso la formazione del frammento proteolitico tBid, derivato da *BH3-interacting domain death agonist* (Bid), una molecola pro-apoptotica citosolica appartenente alla famiglia Bcl-2 (Li et al. 1998). Fas sembra anche attivare una sfingomielinasi acida ed indurre quindi la produzione di ceramide (De Maria et al. 1997). Sia Bid sia ceramide determinano la depolarizzazione della membrana mitocondriale e quindi il rilascio di *citocromo c*, amplificando così l'apoptosi Fas-mediata (Luo 1998).

La regolazione della morte cellulare mitocondriale coinvolge i membri della famiglia di Bcl-2 che comprende molecole strutturalmente simili, ma in grado di mediare sia attivazione che inibizione dell'apoptosi (Adams et al 1998; Reed et al. 1998; Gross et al. 1999). I fattori anti-apoptotici, come Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub>, inibiscono il rilascio del *citocromo c* da parte del mitocondrio (Yang et al. 1997; Kluck et al. 1997). I fattori pro-apoptotici come Bad e Bax sono in grado di creare pori sulla membrana mitocondriale esterna, favorendo così il rilascio del *citocromo c* (Schendel et al. 1998).



**Figura 1.** Schema dei più importanti *pathways* apoptotici. DD, "Death Domain"; DED "Death Effector Domain"

## 2-APOPTOSI NEL SISTEMA IMMUNITARIO

L'apoptosi svolge un ruolo molto importante nel sistema immunitario, durante il processo di selezione dei linfociti negli organi linfatici primari, nel processo della tolleranza periferica, per la funzione effettrice delle cellule citotossiche nei tessuti periferici e nella terminazione della risposta immunitaria (Krammer et al. 2000).

### 2.1-Apoptosi nello sviluppo dei linfociti

Nel corso della loro maturazione, rispettivamente nel midollo osseo e nel timo, i precursori dei linfociti B e T inizialmente riarrangiano in modo casuale i geni per i rispettivi recettori per l'antigene (Ig per i linfociti B e TCR per i linfociti T) (Craxton et al. 1999; Sebзда et al. 1999) e successivamente subiscono un rigoroso processo di selezione clonale che porta alla morte per apoptosi dei linfociti che riconoscono antigeni autologhi (*selezione negativa*). In questa fase maturativa del linfocita infatti, il recettore per l'antigene trasmette segnali apoptotici piuttosto che attivatori. Grazie a questo processo, il repertorio di recettori per l'antigene che passa in periferia sarà costituito principalmente da recettori per antigeni estranei (*non-self*).

Nel timo, organo in cui avviene la maturazione dei linfociti T, questo processo di selezione del "repertorio" periferico è complicato ulteriormente dal particolare meccanismo di riconoscimento dell'antigene proprio dei linfociti T. Questi infatti non riconoscono l'antigene in forma nativa, ma solo dopo che esso è stato "processato" dalle cellule presentanti l'antigene ed esposto come peptide complessato ad una molecola MHC. Il TCR riconosce poi il complesso peptide-molecola MHC. In una prima fase della selezione timica, definita di *selezione positiva*, viene consentita la sopravvivenza solo dei timociti i cui TCR si adattano alle molecole MHC espresse dalle cellule epiteliali timiche; tutti gli altri timociti non ricevono questo segnale di sopravvivenza e muoiono per apoptosi (Amsen et al. 1998). Durante una seconda fase si verifica il processo di *selezione negativa* in cui si ha la delezione clonale dei timociti esprimenti un TCR specifico per peptidi *self* associati alle molecole MHC *self*. L'insieme di questi due processi porta ad un repertorio di linfociti T in grado di riconoscere agenti patogeni, ma tollerante nei confronti del *self*.

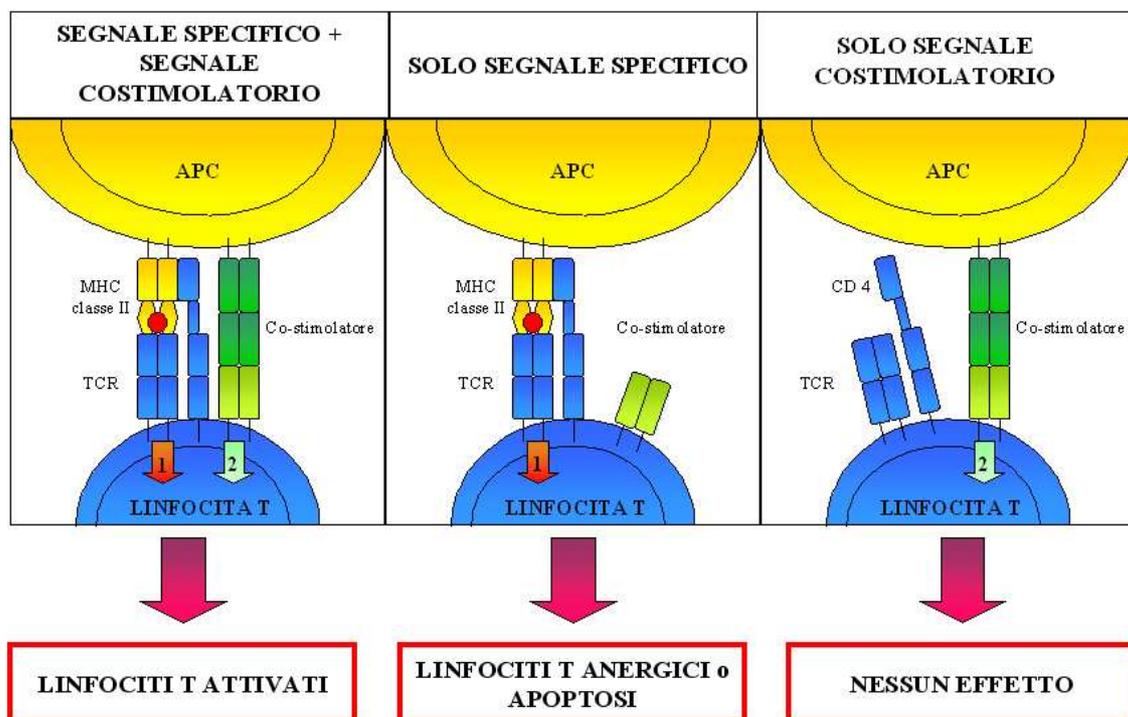
### 2.2-Apoptosi nella tolleranza periferica

La delezione dei cloni linfocitari autoreattivi non si esaurisce nella selezione a livello degli organi linfatici primari. Questo filtro, infatti, non riesce a riconoscere tutti i

cloni autoreattivi poiché non tutti gli antigeni *self* sono rappresentati nel midollo osseo e nel timo. L'immissione in periferia di linfociti T potenzialmente autoreattivi non porta necessariamente allo sviluppo di malattie autoimmuni in quanto queste cellule possono ancora essere controllate da meccanismi di tolleranza periferica.

L'attivazione del linfocita, che porta alla sua proliferazione e al differenziamento a linfocita effetore, richiede la concomitanza di due segnali: un *primo segnale* legato all'interazione del recettore per l'antigene con l'antigene stesso e un *secondo segnale* legato alla stimolazione di una molecola costimolatoria del linfocita T (Frauwrith et al 2002). Nel caso del linfocita T la molecola costimolatoria è CD28, che interagisce con i ligandi CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2) espressi dalle APC (*Antigen Presenting Cells*) attivate. CD28 induce la proliferazione dei linfociti T, la sintesi di IL-2 e l'espressione di proteine anti-apoptotiche come Bcl-X<sub>L</sub> (Chambers et al. 1997; Boise et al. 1995).

Il riconoscimento dell'antigene in assenza del secondo segnale, porta all'inattivazione del linfocita mediante induzione di anergia o di apoptosi. Questo processo assicura che l'attivazione del linfocita sia controllata con un tipico sistema a "double check". In pratica, questo sistema fa sì che la risposta immunitaria specifica sia attivata esclusivamente in un contesto infiammatorio (ovvero di danno cellulare), il che riduce il rischio di aggressioni contro il *self*.



**Figura 2. Attivazione dei linfociti T.** L'attivazione dei linfociti T necessita di due segnali: 1) il legame del complesso MHC-peptide al TCR; 2) l'interazione delle molecole costimolatorie con i rispettivi ligandi. L'assenza del secondo segnale induce uno stato di anergia clonale o morte cellulare programmata. In assenza del primo segnale non si ha attivazione linfocitaria.

### **2.3-Apoptosi nella citotossicità cellulo-mediata**

La morte cellulare programmata ha una importanza chiave nella citotossicità cellulo-mediata. I CTL e le cellule NK, infatti, riconoscono il bersaglio e lo uccidono innescando l'apoptosi attraverso vari meccanismi (Shresta et al. 1998).

La cellula citotossica degranula e libera *perforina* e *granzimi* nello spazio intercellulare che la separa dal bersaglio (Trapani et al. 1999). Perforina è una molecola dotata di un notevole grado di omologia col fattore C9 del complemento. E' pertanto in grado di polimerizzare sulla membrana della cellula bersaglio producendo dei pori attraverso cui passano i granzimi, proteasi capaci di attivare le caspasi ed innescare la morte cellulare programmata del bersaglio (Blink et al. 1999).

I CTL esprimono FasL che, legandosi a Fas espresso dalla cellula bersaglio, attiva la cascata delle caspasi che innesca l'apoptosi (Sharma et al. 2000).

I linfociti citotossici producono TNF $\beta$  che, interagendo con il recettore, innesca la morte del bersaglio (Vujanovic et al. 2001; Djeu et al. 2002).

L'uccisione del bersaglio per mezzo della morte cellulare programmata offre il vantaggio di non disperdere il contenuto cellulare nel tessuto, come detto in precedenza. Questo, nel caso di bersagli infettati da virus, è particolarmente utile in quanto induce la frammentazione degli acidi nucleici del virus permettendo quindi di "sterilizzare" la cellula prima della fagocitosi da parte del macrofago.

Il fatto che tutti questi meccanismi agiscano attivando il sistema delle caspasi ha indotto i virus a sviluppare meccanismi di immunoevasione basati sul blocco di questo sistema (Seshagiri et al. 1997). I virus possono infatti produrre molecole omologhe agli inibitori fisiologici dell'apoptosi quali FLIP o le IAP che bloccano, rispettivamente, le fasi precoci e tardive della cascata caspasica (Deveraux et al. 1999).

### **2.4-Apoptosi nello spegnimento della risposta immunitaria**

L'apoptosi svolge anche un importante ruolo nello spegnimento della risposta immunitaria al fine di ricomprimere la popolazione di linfociti espansi nel corso della risposta immunitaria stessa, e riportare i valori linfocitari nella norma.

Questo sistema di controllo è importante in quanto: 1) impedisce che vi sia un progressivo accumulo di cloni linfocitari negli organi linfatici secondari nel corso delle successive risposte immunitarie; 2) impedisce che l'accumulo di linfociti si traduca in fattore promuovente lo sviluppo di reazioni autoimmuni e/o di neoplasie linfocitarie.

L'apoptosi dei linfociti attivati nel corso della risposta immunitaria coinvolge due sistemi, uno "passivo" e uno "attivo".

1) Il sistema passivo è legato al venir meno degli stimoli trofici assicurati dalla risposta immunitaria. L'esaurimento dell'antigene, infatti, determina una riduzione della produzione di citochine importanti per la sopravvivenza cellulare e dell'espressione dei loro recettori da parte dei linfociti. Il calo degli stimoli di sopravvivenza causa una diminuzione dei livelli cellulari delle molecole antiapoptotiche e il conseguente innesco di morte cellulare programmata (morte per "*cytokine withdrawal*").

2) Il sistema attivo è invece indipendente dall'esaurimento dell'antigene ed è legato a un "orologio biologico" del linfocita effettore, che lo rende sensibile a segnali apoptotici alcuni giorni dopo l'attivazione cellulare. Il sistema Fas/FasL è il principale sistema molecolare coinvolto nello spegnimento della risposta immunitaria. I linfociti attivati esprimono elevati livelli di Fas e sono sottoposti alla regolazione negativa da parte di linfociti o altri tipi cellulari, che esprimono FasL. Inoltre FasL è espresso costitutivamente, ad elevati livelli, in alcuni tessuti considerati "immunologicamente privilegiati", come l'occhio e il testicolo, e che perciò sono in grado di escludere le cellule immunitarie (O'connell et al. 1999).

La morte del linfocita effettore è favorita da una sua ri-attivazione da parte dell'antigene (si parla allora di AICD *activation-induced cell death*), la quale porta all'attivazione di Fas e di altri "recettori di morte" appartenenti alla famiglia del *TNF receptor* (TNFR) (Kroemer et al.1995). L'apoptosi attiva ha lo scopo di impedire il rischio che la risposta immunitaria, dopo l'eliminazione dell'antigene, si indirizzi erroneamente contro molecole *self* simili alle molecole esogene bersaglio della risposta. Questo errore della risposta immunitaria è considerato uno dei meccanismi alla base dello sviluppo di malattie autoimmuni ed è detto "***mimetismo molecolare***" (Ricci-Vitiani et al. 2000; Mountz et al. 1995).

La deregolazione dell'apoptosi è implicata nella patogenesi di diverse malattie umane tra cui le neoplasie, l'autoimmunità e alcune malattie degenerative (Mullauer et al. 2001). Nei primi due tipi di malattie sono state identificate alterazioni geniche direttamente responsabili di questa deregolazione.

Nelle neoplasie maligne si ha uno squilibrio tra apoptosi e proliferazione a favore di quest'ultima, il che è dovuto al concomitante aumento delle mitosi e riduzione dell'apoptosi (Schulte-Hermann et al. 1995). Nelle malattie autoimmuni si ha un

fallimento della eliminazione apoptotica dei cloni linfocitari autoreattivi (Ravirajan et al. 1999).

### 3-AUTOIMMUNITA'

I sistemi di tolleranza al *self*, che normalmente proteggono ciascun individuo dai linfociti potenzialmente autoreattivi, possono in certi casi fallire e portare allo sviluppo di **autoimmunità**. La presenza di linfociti autoreattivi in periferia non porta necessariamente allo sviluppo di manifestazioni autoimmuni ed è dovuta per lo più ai meccanismi deputati alla tolleranza periferica al *self*.

In molti casi i fattori scatenanti che inducono l'insorgere di una malattia autoimmune sono gli agenti infettivi. Le infezioni possono scatenare la malattia attraverso vari meccanismi:

- la presenza negli agenti infettivi di antigeni omologhi ad antigeni *self* (fenomeno del "mimetismo molecolare") può determinare una reazione crociata contro molecole *self* da parte della risposta anti-agente infettivo dopo che quest'ultimo è stato eliminato;
- l'infezione può danneggiare i tessuti causando la liberazione di antigeni normalmente sequestrati, che, non essendo presenti a livello timico durante la selezione negativa, sono quindi erroneamente riconosciuti come non *self*;
- il processo infiammatorio locale innescato dall'infezione nel tessuto, determina produzione di citochine e la conseguente attivazione delle APC che aumentano l'espressione delle molecole costimolatorie in membrana e attivano i linfociti T autoreattivi.

Le malattie autoimmuni presentano un certo grado di familiarità e per questo sono stati prodotti molti studi volti ad individuare i fattori genetici coinvolti nel loro sviluppo. Nel loro complesso i dati ottenuti disegnano il quadro tipico delle malattie multifattoriali in cui la suscettibilità allo sviluppo della malattia, richiede il concorso di alterazioni geniche, associate all'induzione da parte di fattori scatenanti. Tuttavia spesso non è chiaro se i geni identificati siano direttamente implicati nella patogenesi della malattia oppure se siano dovuti a fenomeni di *linkage disequilibrium*.

Il più noto fattore genetico di predisposizione alle malattie autoimmuni è l'aplotipo HLA. L'associazione HLA/malattia è presente in genere con alleli di classe II, anche se in alcuni casi è stata descritta l'associazione con molecole di classe I. 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 HLA-DR2; quella di sviluppare *miastenia grave* è 5 volte maggiore nei portatori di HLA-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 l'associazione HLA/malattia è dovuta all'efficienza con cui le molecole MHC, codificate dagli alleli predisponenti, presentano i peptidi *self*. 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.

### **3.1-La Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS)**

Un fattore genetico che è stato più recentemente chiamato in causa nello sviluppo dell'autoimmunità è il difetto funzionale del sistema Fas/FasL (Rieux-Leucat et al. 1995; Dianzani et al.1997). Come si è detto in precedenza, Fas è un interruttore di apoptosi espresso dai linfociti attivati ed è coinvolto nello spegnimento della risposta immunitaria e nella eliminazione di gran parte dei linfociti effettori che si sono espansi nel corso della risposta. Se questo processo non funziona in modo corretto, si verifica un accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari con aumentato rischio di sviluppo di malattie autoimmuni. La prima associazione tra autoimmunità e Fas è stata individuata nei topi *lpr* (*lymphoproliferation*) e *gld* (*generalized lymphoproliferative disease*), portatori di mutazioni recessive rispettivamente a carico del gene di Fas (cromosoma 19), e del gene che codifica per FasL (cromosoma 1) (Adachi et al. 1995). Topi omozigoti per la mutazione (*lpr/lpr* o *gld/gld*) sviluppano un quadro caratterizzato da:

- 1) ridotta funzionalità di Fas;
- 2) linfadenopatia, splenomegalia;
- 2) autoimmunità con ipergammaglobulinemia, produzione di autoanticorpi, glomerulonefrite, artrite, vasculite;
- 3) espansione policlonale in periferia di linfociti T TCR  $\alpha\beta^+$  privi di CD4 e CD8 (propri dei T helper e dei T citotossici, rispettivamente) e per questo detti "doppi negativi" (DN).

Nei topi *lpr* sono state identificate due tipi di alterazioni genetiche, una impedisce l'espressione in superficie di Fas (mutazione *lpr*), mentre l'altra porta all'espressione di una molecola di Fas incapace di trasmettere il segnale apoptotico alla cellula (mutazione *lpr<sup>cg</sup>*). I topi *gld* sono invece caratterizzati da una mutazione a livello della porzione extracitoplasmatica di FasL con conseguente alterazione del sito di legame con Fas.

Il nesso causale tra l'alterata funzione del sistema Fas/FasL e la malattia è stato confermato dall'osservazione che topi *knockout* per Fas sviluppano un quadro simile a quello dei topi *lpr* e *gld*. Inoltre, è possibile correggere il difetto nei topi *lpr* mediante l'espressione della forma *wild-type* di Fas (Wu et al. 1994).

Nell'uomo è stata descritta una malattia simile a quella dei topi *lpr* o *gld* denominata *sindrome autoimmune/linfoproliferativa (ALPS)* (Fisher et al. 1995; Straus et al. 1999; Rieux-Leucat et al. 1995; Drappa et al. 1996; Bettinardi et al. 1997; Fleisher et al. 2001

L'ALPS è una rara malattia caratterizzata da linfoproliferazione, espansione periferica di linfociti T TCR  $\alpha\beta$ + doppi-negativi (DN) e difettiva apoptosi linfocitaria Fas-mediata. Nei pazienti ALPS si osservano spesso autoimmunità e aumentato rischio di sviluppo di linfomi e, clinicamente, presentano una difettiva omeostasi linfocitaria (Straus et al. 2001). La linfoproliferazione dipende da una graduale espansione di linfociti non sottoposti al normale processo di morte cellulare programmata. Questa proliferazione comporta un accumulo di linfociti (sia B che T) negli organi linfatici secondari, tra cui linfonodi, timo, fegato e milza, accumulo che inizia nei primi anni dell'infanzia.

I linfociti T DN, che normalmente rappresentano meno dell'1% delle cellule del sangue periferico, nei pazienti ALPS possono raggiungere il 40% (Blessing et al. 2001) e sembrano avere un ruolo cruciale nello sviluppo della malattia. In alcuni pazienti ALPS, privi di mutazioni germinali in Fas, Holzlova et al. hanno trovato una popolazione di linfociti T DN con mutazioni somatiche dominanti nel recettore di morte. Queste mutazioni sembrano essere sufficienti a causare la malattia; i linfociti DN sono i principali produttori degli elevati livelli di IL-10 che si osservano nei pazienti ALPS, a differenza di ciò che accade nel soggetto sano e anche nei parenti di pazienti ALPS con mutazioni in Fas o difetti apoptotici (Lopaun et al. 2001). Oltre ad un'elevata produzione di IL-10, gli ALPS presentano anche elevati livelli di IL-4 e IL-5 e bassi livelli di IL-2 e IFN- $\gamma$  (Lopaun et al. 2001; Fuss et al. 1997). Questo profilo citochinico è caratteristico dei linfociti Th2, che inibiscono l'immunità cellulo-mediata promuovendo la risposta umorale e quindi l'eventuale produzione di autoanticorpi.

L'ALPS è infatti caratterizzato anche dallo sviluppo di manifestazioni autoimmuni; molti pazienti presentano elevati livelli sierici di immunoglobuline e autoanticorpi. In contrasto con altre patologie autoimmunitarie nell'ALPS gli autoanticorpi sono prevalentemente diretto contro il sistema ematopoietico.

Anticorpi anti-cardiolipina sono frequenti, ma non si associano necessariamente allo sviluppo di malattie tromboemboliche (Sneller et al. 2003). Molti pazienti presentano anemie emolitiche e/o trombocitopenie autoimmuni (Sneller et al. 2003). Manifestazioni autoimmuni meno frequenti nell'ALPS includono anticorpi anti-nucleo, fattori reumatoidi, neutropenie autoimmuni, glomerulonefriti, epatiti autoimmuni, vasculiti, anticorpi anti-fattore VIII con coagulopatie (Sneller et al. 2003; Wong et al. 2004).

Benché la linfoproliferazione sia inizialmente non maligna, i pazienti ALPS, come detto precedentemente, hanno una marcata tendenza allo sviluppo di linfomi a cellule B e T. Sono stati osservati linfomi in pazienti ALPS portatori di mutazioni in Fas che causano severi difetti apoptotici. In questi si ha un'incidenza rispettivamente 14 volte e 51 volte maggiore di linfomi non-Hodgkin e Hodgkin (Straus et al. 2001).

Come nel modello murino, anche nei pazienti con ALPS la funzionalità di Fas è ridotta a causa di mutazioni inattivanti ereditarie a carico di geni coinvolti in questo sistema. Nei pazienti con ALPS di tipo Ia (ALPS-Ia) il difetto genetico è a carico del gene codificante per Fas (Choi et al. 1999); nei pazienti con ALPS-Ib è mutato il gene di FasL; nei pazienti con ALPS-II è mutato il gene di caspasi-10, coinvolta nella trasduzione del segnale di Fas (Wang et al. 1999). Infatti caspasi-10 viene reclutata da vari recettori di morte, come Fas, TNF-R o TRAIL-R, attraverso la molecola adattatrice FADD (Vincenz et al. 1997). Il deficit di caspasi-10 nei pazienti con ALPS II comporta un'alterazione dell'omeostasi dei linfociti e delle cellule dendritiche con accumulo delle stesse nelle aree paracorticali dei linfonodi. Normalmente le cellule dendritiche sono sensibili alla morte indotta da TRAIL, il ligando per i DR4 e DR5, ma meno responsive a Fas e TNF (Wang et al. 1999). Le cellule dendritiche con la mutazione in caspasi-10 risultano invece essere resistenti a TRAIL e ciò può essere alla base dell'accumulo. Le cellule dendritiche, come illustrato in precedenza, sono APC molto efficaci per stimolare i linfociti B e T, il cui *turn-over* è essenziale per la regolazione della risposta immunitaria (Bancherau et al. 1998). La persistenza di queste cellule nei pazienti ALPS II può bloccare lo spegnimento della risposta, contribuendo così alla genesi della autoimmunità.

In altri pazienti Fas non funziona, ma il difetto genetico non è ancora stato identificato: si parla in questi casi di ALPS-III (Van der Werff et al. 2001). Recentemente, mutazioni nel gene di NRAS sono state associate allo sviluppo di un altro tipo di ALPS (ALPS IV) (Oliveira et al 2007)

#### **4-LE CASPASI**

Le caspasi sono una classe di proteasi intracellulari comuni negli organismi multicellulari. Esse mediano sia la morte cellulare sia l'infiammazione attraverso il taglio proteolitico di particolari substrati coinvolti in questi due processi cellulari, apparentemente distinti. In *Caenorhabditis elegans*, la caspasi CED-3 rappresenta un componente essenziale del processo di morte cellulare programmata. Gli omologhi di CED-3 nei mammiferi (caspase-3, -6 e -7) vengono definiti caspasi effettrici in quanto inducono apoptosi in seguito a diversi stimoli. Una classe filogeneticamente distinta di caspasi (caspasi-1, -4, -5, -11 e -12) porta al rilascio di mediatori dell'infiammazione attraverso il processamento proteolitico dei precursori delle citochine proinfiammatorie IL-1 $\beta$  e IL-18 (Martinon et al. 2004). Una terza classe comprende, nei vertebrati, le caspasi-2, -8, -9 e -10, definite caspasi iniziatrici in quanto svolgono la loro funzione a monte delle caspasi effettrici durante l'apoptosi.

Una deregolazione dell'attività caspasicca potrebbe essere letale per la cellula e quindi per prevenire questo la cellula produce la proteina come precursore (zimogeno) che richiede un ulteriore evento di attivazione. Tutte le caspasi sono costituite da un predominio N-terminale e da due subunità, una grande (p20) e una piccola (p10). In alcuni casi queste subunità sono separate da una regione linker probabilmente coinvolta nel meccanismo di attivazione delle stesse.

Recenti studi suggeriscono che il meccanismo di attivazione delle caspasi iniziatrici ed effettrici sia completamente diverso. Sebbene non siano ancora del tutto conosciuti i dettagli dell'evento di attivazione caspasicca, ad oggi si afferma che l'attivazione delle caspasi iniziatrici e probabilmente anche di quelle proinfiammatorie richieda la dimerizzazione delle pro-forme inattive, processo che accade in vivo attraverso il reclutamento di un complesso macromolecolare definito "piattaforma di attivazione". Diversamente da ciò che accade per le caspasi iniziatrici, gli zimogeni delle caspasi effettrici si trovano già dimerizzati nel citosol della cellula che li produce. Questi dimeri inattivi vengono poi successivamente attivati attraverso taglio proteolitico delle due subunità operato dalle caspasi iniziatrici e, occasionalmente, da altre specifiche proteasi.

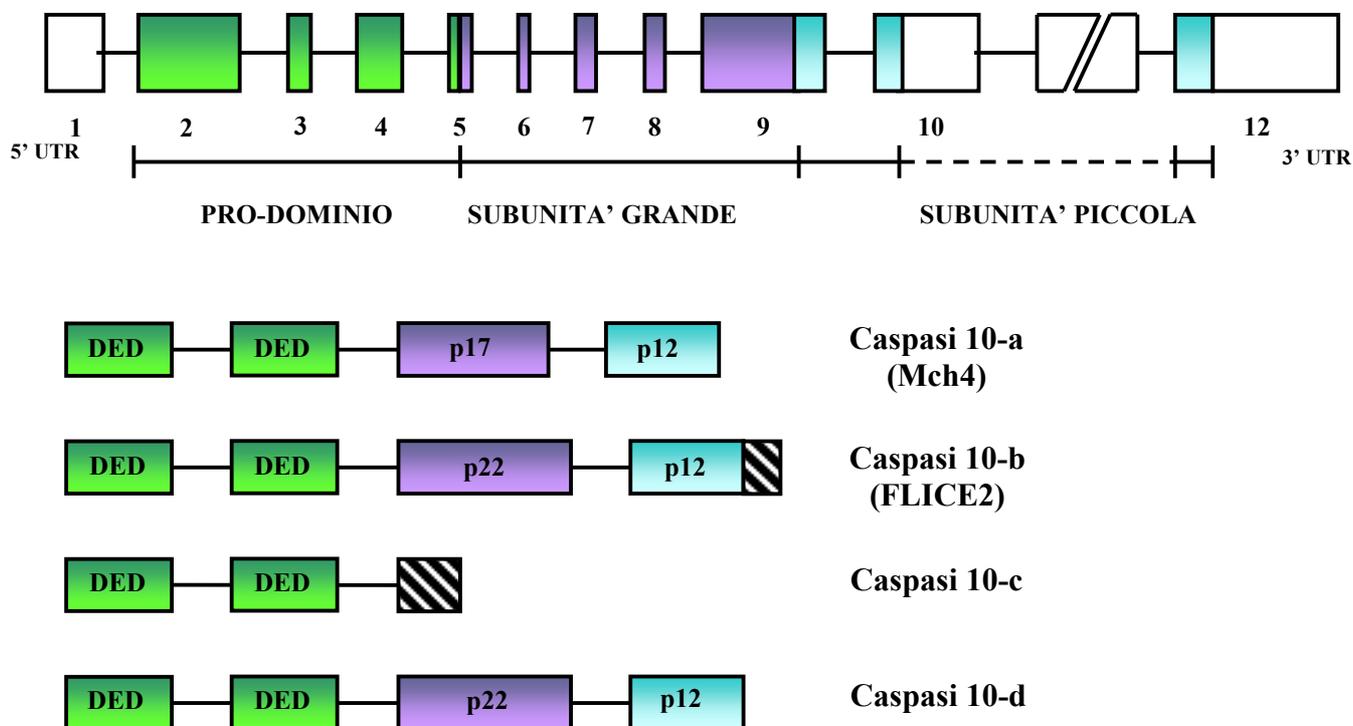
(Mitti et al. 1997; Chai et al. 2001; Talanian et al. 1996; Pop et al. 2001; Kang et al. 2002; Shiozaki et al. 2003; Boatright et al. 2003).

## 4.1-Caspasi-10

### 4.1.1-Struttura

Il gene umano di caspasi-10 (CASP10), localizzato sul cromosoma 2q33-34 (Fernandes-Alnemri et al. 1996; Vincenz and Dixit, 1997), è costituito da 12 esoni, codificanti per una proteina di circa 521 aminoacidi (circa 58KDa di peso molecolare). Gli esoni 2-4 codificano per il predominio N-terminale della proteina costituito da due *Death Effector Domain*, responsabili dell'interazione con FADD nell'induzione del segnale apoptotico. Gli esoni 5-9 codificano per la subunità grande di caspasi-10 (p17/22), mentre gli esoni 10 e 12 codificano per quella piccola (p12). Caspasi-10 è stata identificata grazie ad un clonaggio per omologia con l'altra caspasi iniziatrice della via estrinseca dell'apoptosi, caspasi-8 (Fernandes-Alnemri et al. 1996; Vincenz and Dixit, 1997).

Esistono 4 differenti isoforme di caspasi-10 che si originano in seguito a fenomeni di splicing alternativo (vedi figura 3)



**Figura 3. Struttura del gene di caspasi-10 e isoforme della proteina.** Gli esoni 2-4 codificano per il prodominio, 5-9 per la subunità grande, 10-12 per la subunità piccola. DED= "Death Effector Domain", p17/p22 sono le subunità grandi e p12 rappresenta la subunità piccola.

#### 4.1.2-Funzione

Caspasi-10, omologa di caspasi-8, sembra svolgere anch'essa la funzione di iniziatrice del processo apoptotico mediato dai recettori di morte. C'è però in letteratura un dibattito riguardo la capacità di caspasi-10 di sostituire funzionalmente caspasi-8 nel processo apoptotico. Un primo lavoro effettuato su una linea di Jurkat privata del gene di caspasi-8 aveva dimostrato l'essenzialità di questa proteina nell'apoptosi mediata dai recettori di morte (Juo et al. 1998). Studi successivi hanno però rilevato che questa stessa linea cellulare esprime bassi livelli anche di caspasi-10, sostenendo che la trasfezione di queste cellule Jurkat-caspasi-8 deficienti con caspasi-10 fosse sufficiente a sensibilizzarle all'apoptosi Fas e TRAIL-mediata (Kischel et al. 2001; Wang et al. 2001). Sprick et al. hanno in seguito dimostrato il reclutamento di caspasi-10 nel DISC di Fas e TRAIL, sottolineando però l'incapacità di caspasi-10 di sostituire funzionalmente caspasi-8, e suggerendo quindi una diversa funzione per le due proteine (Sprick et al. 2002). Se dalle analisi *in vitro* caspasi-8 e caspasi-10 sembrano avere funzioni in parte distinte, anche nell'uomo la situazione è simile. Mutazioni in caspasi-10 sono state recentemente associate alla Sindrome autoimmune linfoproliferativa di tipo II (ALPS-II) (Wang et al. 1999). In particolare la sostituzione L285F in eterozigosi comporta un deficit dell'apoptosi Fas e TRAIL mediata rispettivamente nei linfociti e nelle cellule dendritiche del paziente, e ciò può essere alla base del quadro linfoproliferativo e autoimmune della malattia. Pazienti invece mutati in caspasi-8, oltre ad esibire difetti nell'apoptosi dei linfociti, presentano anche un deficit di attivazione degli stessi, con conseguente sviluppo di immunodeficienza (Chun et al. 2002). Questa immunodeficienza associata a mutazioni in caspasi-8 contrasta con il fenotipo autoimmune degli individui con deficit di caspasi-10, sebbene i due enzimi abbiano una profonda omologia strutturale. In conclusione questi studi suggeriscono che sebbene ci sia un certo grado di sovrapposizione, caspasi-8 e -10 potrebbero avere funzioni anche distinte.

## **SCOPO DEL LAVORO**

La sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS) è una malattia geneticamente eterogenea. Alla base vi è il deficit funzionale della via di trasduzione Fas-mediata e tra i fattori genetici che concorrono allo sviluppo della malattia, vi sono mutazioni nei geni che codificano per Fas (ALPS Ia), FasL (ALPS Ib) e caspasi-10 (ALPS II). L'alterazione genetica nei pazienti ALPS III non è stata ancora identificata. Recentemente, mutazioni nel gene di NRAS sono state associate allo sviluppo di un altro sottogruppo di ALPS (ALPS IV). Le mutazioni note sono presenti, in genere, in eterozigosi, vengono ereditate da un genitore sano e pertanto non sono in grado da sole di portare allo stato conclamato della sindrome. Il concorso di mutazioni in altri geni è suggerito dal fatto che il genitore privo della mutazione presenta anch'esso un difetto nell'apoptosi mediata da Fas.

Durante la ricerca di mutazioni nei geni noti nei pazienti ALPS, abbiamo trovato due pazienti portatori eterozigosi di mutazioni sia nel gene di Fas, sia nel gene di caspasi-10. Il primo paziente porta una sostituzione nel sito accettare di splicing nell'introne 3 del gene di Fas e la nuova sostizione P501L in caspasi-10. Il secondo paziente è invece portatore della mutazione in Fas Q47X, e della sostituzione Y446C in caspasi-10. Scopo di questo lavoro è stato quindi la caratterizzazione funzionale di queste mutazioni, in particolare della nuova sostituzione P501L in caspasi-10. Abbiamo voluto inoltre valutare se ci fosse un'effetto cooperativo di queste mutazioni nello sviluppo dell'ALPS.

# **MATERIALI E METODI**

## **1-PAZIENTI**

La diagnosi di ALPS si è basata sulla presenza dei seguenti criteri:

- 1) presenza di autoimmunità;
- 2) presenza di linfadenopatie croniche non maligne (due o più linfonodi ingrossati con un diametro superiore ai 2 cm) e/o splenomegalia;
- 3) difettiva apoptosi Fas-indotta *in vitro*;

I geni di Fas, FasL e caspasi-10 sono stati sequenziati da DNA genomico per investigare la presenza di mutazioni associate all'ALPS.

Sono stati analizzati anche controlli sani, etnicamente correlati, provenienti dal Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università del Piemonte Orientale, dal reparto di Pediatria dell'Ospedale Maggiore di Novara e da Milano

I prelievi di sangue periferico sono stati ottenuti da pazienti e controlli sotto consenso informato. Lo studio è stato effettuato secondo le linee guida del comitato etico locale.

## **2-SEPARAZIONE SU GRADIENTE DI FICOLL DI SANGUE INTERO**

I campioni di sangue eparinato, prelevato da pazienti o soggetti sani di controlli sono stati diluiti in rapporto 1:1 con PBS 1X. La separazione di cellule mononucleate di sangue periferico (PBMCs) è stata ottenuta tramite centrifugazione su gradiente di densità discontinuo utilizzando Ficoll (Hypaque). Le cellule ottenute sono state contate mediante l'utilizzo di una camera di Bürker, e messe in coltura, alla concentrazione di  $5 \times 10^5$  cellule/mL, in terreno RPMI 1640 (Gibco Life Technologies, Gaithersurg, MD) supplementato di siero fetale bovino (FBS - Gibco Life Technologies, Gaithersurg, MD) al 10% e di IL-2 (Sigma-Aldrich corporation, St Louis, Missouri ), a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>.

## **3-ANALISI IMMUNOFENOTIPICA**

L'espressione di molecole di superficie è stata valutata con immunofluorescenza diretta e analisi al citofluorimetro (FACScan, Becton-Dickinson, San Jose, CA). Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali (mAbs): anti-CD3 (Leu-4), anti-CD4 (Leu-3a), anti-CD8 (Leu-2a), anti-TCR $\alpha\beta$  (Becton-Dickinson), anti-Fas (Immunotech, Marseilles, France).

Le cellule CD4<sup>-</sup> e CD8<sup>-</sup> TCRαβ<sup>+</sup> sono state visualizzate con immunofluorescenza a due colori, utilizzando anticorpi mAb anti-TCR coniugato con FITC, mAbs anti-CD4 e anti-CD8 coniugato con PE. Fas è stato visualizzato con immunofluorescenza a due colori su linfociti T attivati e non usando anticorpi mAb anti-TCRαβ coniugato PE e anti-Fas FITC-coniugato (Chemicon, Temecula, CA).

#### **4-SAGGIO DI SOPRAVVIVENZA CELLULARE**

La morte cellulare indotta dalla stimolazione di Fas è stata valutata su linee linfocitarie T ottenute da PBMCs attivati con 1 µg/ml (t=0) e 0.1 µg/ml (t=12) di PHA e coltivate in RPMI 1640 + 10% FBS + 2U/ml di rIL-2 (Sigma-Aldrich corporation, St Louis, Missouri). La funzione di Fas è stata valutata a 6 giorni dalla seconda stimolazione (t=21 di coltura).

Le cellule sono state incubate con terreno di controllo o con un terreno contenente un anticorpo monoclonale agonista anti-Fas (1 µg/ml - CH11, isotipo IgM-Upstate Charlottesville,VA, USA) in presenza di rIL-2 (1U/ml) per minimizzare la morte cellulare spontanea e di 5% FBS per impedire la crescita cellulare durante l'incubazione. La sopravvivenza cellulare è stata valutata 18 ore dopo contando le cellule vive in ciascun pozzetto al microscopio ottico con camera di Bürker, in seguito a colorazione con Tripan Blue . Il test è stato eseguito in triplo e la vitalità analizzata in cieco.

Le cellule di due controlli sani sono state incluse in tutti i test come controlli positivi. I risultati sono stati espressi come sopravvivenza cellulare relativa percentuale, calcolati secondo la seguente formula: (cellule vive dopo stimolo apoptotico/cellule vive non trattate) x 100. Il limite superiore di normalità per la sopravvivenza cellulare in risposta ad anticorpi anti-Fas, è stato definito come media + 2 DEV.ST. dei dati ottenuti da 68 controlli sani; le risposte tra la media + 1 DEV.ST. e la media + 2 DEV.ST. sono state definite come "border-line".

#### **5- SAGGIO DELL' ATTIVITA' DI CASPASI-10**

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) 6x10<sup>6</sup> cellule sono stati incubati con anticorpo agonista anti-FAS (1µg/ml) in terreno RPMI 1640 con 5% FBS in ghiaccio per 30 minuti, successivamente trasferite a 37°C per 3 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-10. Il kit utilizzato (Caspase-10 Fluorometric Assay Kit, MBL) prevede, l'incubazione di 50 µg di lisato totale in tampone in presenza di un substrato specifico (AEVD-AFC) che, soggetto all'azione proteolitica della caspasi-10, 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. Il saggio di attività di caspasi-10 è stato effettuato anche sui lisati cellulari delle 293T trasfettate.

## **6-CLONAGGIO DEL CDNA CODIFICANTE PER CASPASI-10 *WILD-TYPE* E MUTATA**

### **6.1-Estrazione di RNA totale**

L'RNA totale è stato estratto da pellet di cellule mediante l'ausilio del kit "RNeasy Mini", (Qiagen). L'RNA è stato risospeso in acqua trattata con Dietilpirocarbonato (DEPC) in modo da eliminare le Rnasi presenti e la sua concentrazione è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro.

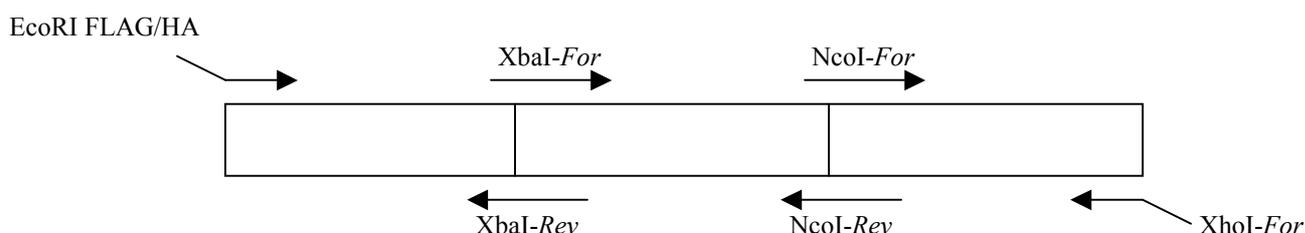
### **6.2-RT-PCR**

5µg di RNA estratto da PBMC del paziente in studio 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'. Nella miscela è presente anche l'oligodT, omologo alla sequenza poliA presente in tutti gli mRNA, ed utilizzato come innesco della reazione di retrotrascrizione. Il campione viene quindi trasferito in ghiaccio, per permettere l'appaiamento tra l'oligonucleotide e il suo stampo. Al campione vengono aggiunti: il tampone di reazione 5X (250mM Tris acetato, pH 8.4, 375 mM K acetato, 40mM Mg acetato), 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 ora a 60°C e 5' a 85°C.

### 6.3-Amplificazione del cDNA codificante per caspasi-10

Per amplificare il cDNA codificante per la caspasi-10, mutata e *wild-type*, abbiamo scelto alcuni oligonucleotidi *forward* e oligonucleotidi *reverse* (XbaI-For\Rev, NcoI-For\Rev) contenenti i siti unici di restrizione presenti nel cDNA di caspasi-10, per permettere il successivo clonaggio dei frammenti.



**Figura 4. Schema della strategia di clonaggio.** Sono illustrati il cDNA di caspasi-10 ed i primers utilizzati per amplificarne i diversi frammenti.

Il primer *forward* EcoRI FLAG per l'amplificazione della caspasi-10 *wild-type* è stato disegnato in modo da aggiungere al trascritto la sequenza nucleotidica dell'epitopo FLAG (epitopo sintetico), mentre il primer per la caspasi-10 mutata in modo da aggiungere la sequenza nucleotidica dell'epitopo HA (derivato dal batterio *Haemophilus Influenzae*).

Le sequenze nucleotidiche dei sette primers utilizzati sono riportate di seguito:

PRIMERS	SEQUENZA 5'-3'
C10FLAG	CCGAATTCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGAAATCTCAAGGTCAACATTGG'
C10HA	CCGAATTCATGTACCCTTATGATGTGCCAGATTATGCCCTCAAATCTCAAGGTCAACATTGG
C10XbaI-For	GGCATTCTAGAGAAACAAGG
C10XbaI-Rev	CCTTGTTCTCTAGAAATGCC
C10NcoI-For	GTTCTGTATTCTGACCCATGGGAG
C10NcoI-Rev	TCCAAATCTCCCATGGGTC
C10XhoI-Rev	CCGCTCGAGTAATGAAAGTGCATCCAG

**Tabella 1.** Sequenze dei primers utilizzati per amplificare il cDNA di caspasi-10.

I frammenti di interesse sono stati ottenuti mediante PCR sul cDNA del paziente in studio e del controllo. Le condizioni di reazione per le singole coppie di primers sono indicate nella tabella 2.

PRIMERS	Concentrazione di MgCl <sub>2</sub>	Temperatura di “annealing”
C10FLAG\C10XbaI-Rev	3 mM	54°C
C10HA\C10XbaI-Rev	3 mM	54°C
C10XbaI-For\C10NcoI-Rev	3 mM	53°C
C10NcoI-For\C10XhoI-Rev	3 mM	60°C

**Tabella 2.** Condizioni di PCR per i frammenti del cDNA di caspasi-10

La miscela di reazione è composta dal tampone di reazione (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0,5 µM di ciascun oligonucleotide, 0,2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi, e 1,25 U Taq DNA polimerasi (5U/µl) (Invitrogen). Le reazioni di PCR necessitano per avvenire di MgCl<sub>2</sub> nelle condizioni opportune indicate in Tabella 2.

Le condizioni di reazioni prevedono: 1 ciclo di denaturazione a 94°C 5'; seguito da 35 cicli composti da una fase denaturativa a 94°C per 30'', una di appaiamento alle diverse T di “annealing” (vedi tabella 2) a seconda della coppia di primers utilizzati per 30'' (eccetto per la coppia C10NcoI-For\C10XhoI-Rev 45''), e una di sintesi a 72°C per 1 min. Il programma termina con un ciclo di sintesi a 72°C per 10' al fine di consentire alla Taq polimerasi di completare i frammenti polimerizzati.

L'utilizzo di queste coppie di primers ha permesso di amplificare 4 frammenti: C10FLAG\C10XbaI-Rev e C10HA\C10XbaI-Rev di circa 500bp, C10XbaI-For\C10NcoI-Rev di circa 600bp e C10NcoI-For\C10XhoI-Rev 550bp. Gli amplificati sono stati purificati mediante elettroforesi ed estrazione da gel d'agarosio per essere successivamente clonati in pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI).

#### 6.4-Elettroforesi su gel d'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.

#### 6.5-Estrazione da gel d'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.

### **6.6-Sequenziamento Automatico**

I prodotti di PCR sono stati purificati usando una miscela di due enzimi idrolitici (Exo-Sap) in rapporto 1:1. L'esonucleasi I è in grado di degradare i primers a singolo filamento o un eventuale frammento di DNA a singolo filamento, che si è formato nella reazione di PCR; l'enzima SAP, invece, (Shrimp Alkeline Phosphatase), idrolizza i dNTPs rimasti nella miscela di PCR. Tali residui potrebbero interferire con il processo di sequenziamento o qualsiasi altra applicazione che richiede che i prodotti siano liberi da una contaminazione di dNTPs o primers. La reazione di purificazione prevede un'incubazione di 20 minuti a 37°C e un passaggio successivo di 20 minuti a 80°C per inattivare i due enzimi.

Una volta che i prodotti di PCR sono stati purificati si può procedere all'allestimento della reazione di sequenza partendo da una concentrazione di 30-40 ng di DNA.

Il metodo di sequenziamento automatico prevede una reazione simile al metodo enzimatico di Sanger, in cui mediante PCR vengono incorporati nella sequenza genica nucleotidi 'terminatori' marcati con quattro fluorocromi distinti (BigDye Terminator v1.1, Applied Biosistem). Le diverse fluorescenze emesse dai fluorocromi, vengono rivelate da un laser e registrate da un computer. Le reazioni di sequenziamento sono quindi state ottenute mediante l'utilizzo del kit "ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v1.1" (Applied Biosistem). 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 (A-B-C-D-Dye terminator marcati rispettivamente con di cloro [R6G]-[ROX]-[R110]-[TAMRA], deossinucleosidi trifosfato, Ampli-Taq DNA-polimerasi, MgCl<sub>2</sub>, Tris-HCl, pH 9) e il primer (3,2 µM/µl). La reazione di sequenziamento prevede l'utilizzo del seguente programma: un ciclo a

96°C per 1' seguito da 25 cicli composti da un passaggio a 96°C per 10''; un passaggio a 50°C per 5'' e un passaggio a 60°C per 4'.

Il prodotto della reazione è stato purificato, al fine di eliminare gli oligonucleotidi non incorporati, mediante il kit Montage SEQ<sub>96</sub> Sequencing Reaction Cleanup (Montage). 5 µl del purificato sono stati addizionati a 10 µl di formammide e denaturati (3' a 95°C), e caricati su piastra ottica per la successiva analisi al sequenziatore.

## 6.7-Vettori utilizzati per il clonaggio

### 6.7.1-pGEMT Easy Vector

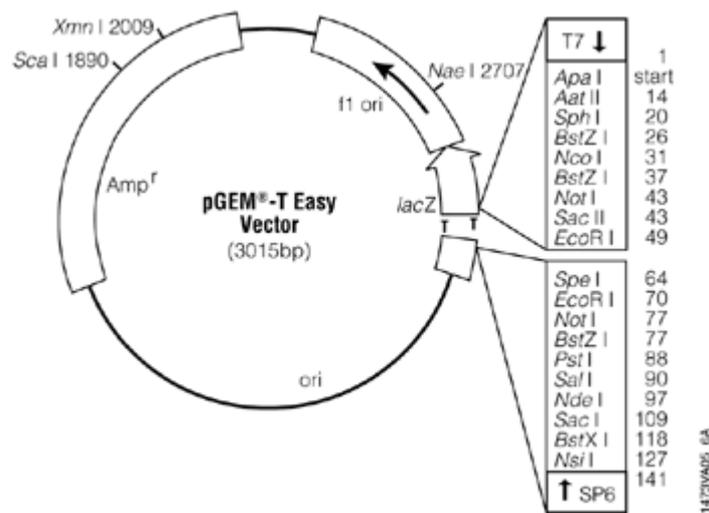
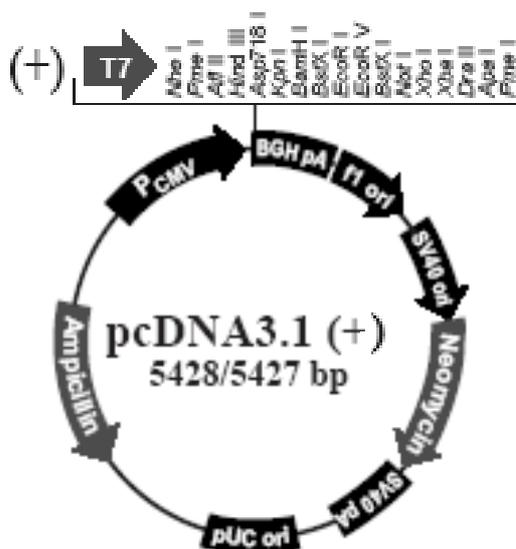


Figura 5. Mappa del vettore pGEM-T Easy Vector

Il pGEM-T Easy Vector System (Promega) è un sistema utile al clonaggio di prodotti di PCR. Il vettore possiede due timidine ad entrambe le estremità al 3'; queste aumentano notevolmente l'efficienza di legazione dei prodotti di PCR nel plasmide, prevenendo la ricircularizzazione del vettore. Il vettore contiene i promotori T7 ed SP6 della RNA polimerasi che fiancheggiano il sito multiplo di clonaggio posto all'interno della regione codificante per l' $\alpha$ -peptide dell'enzima  $\beta$ -galattosidasi. L'inattivazione dell' $\alpha$ -peptide in seguito all'inserzione dell'inserto permette di discriminare direttamente i cloni ricombinanti attraverso screening colorimetrico. Il vettore contiene inoltre un'origine di replicazione del fago f1 (f1 ori) e una sequenza codificante per la resistenza alla Ampicillina per permettere la selezione delle cellule trasformate.

### 6.7.2-pcDNA 3.1



**Figura 6. Mappa del vettore pcDNA3.1**

Il vettore pcDNA3.1 (+) (Invitrogen), rappresentato in Figura 13, è ideato per avere un alto livello di espressione nelle cellule eucariotiche.

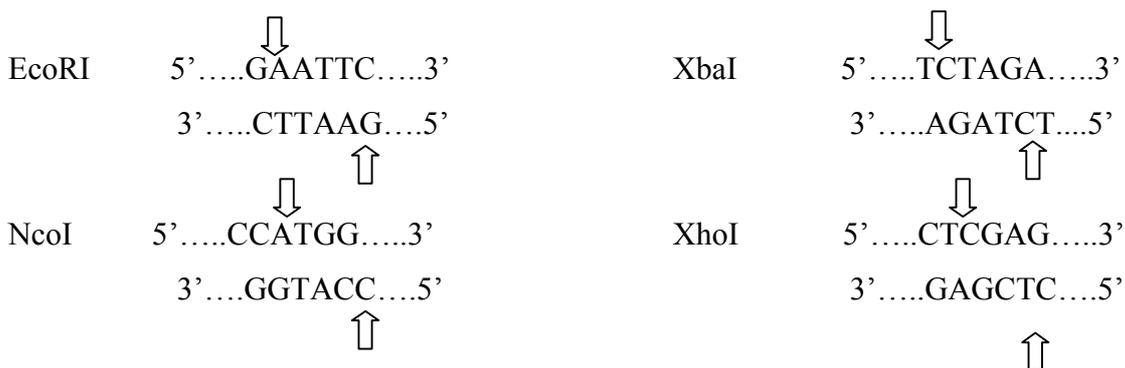
Il vettore contiene (A) un ‘multiple cloning site’ (MCS) posto di seguito al promotore precoce del *Citomegalovirus* (CMV) che garantisce un alto livello di espressione in un’ampia varietà di cellule di mammifero; (B) il segnale di poliadenilazione di SV40, un’origine SV40 per la replicazione in cellule eucariotiche che esprimono l’antigene T SV40; (C) una sequenza codificante per la resistenza alla Neomicina per permettere la selezione di cellule trasfettate stabilmente, e (D) una per la resistenza all’ Ampicillina che permette selezione ed amplificazione del vettore in *Escherichia coli*.

### 6.8-Digestione enzimatica e ligazione

3-6 µg di pcDNA3.1 e di pGEMT + frammenti del cDNA codificante per la caspasi-10 (forma WT e forma MUT, 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 all’interno dei primers *forward* (C10FLAG e C10HA), XbaI e NcoI all’interno del cDNA di C10, e XhoI nell’oligo C10XhoI-Rev.

Di seguito sono mostrate le sequenze nucleotidiche riconosciute dai due enzimi con evidenziati dalle frecce i siti di taglio:



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 (inserti) e dal vettore con un eccesso dei primi 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.

### 6.9-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, per permettere l'adesione del DNA alla capsula batterica. Successivamente, è stato indotto uno shock termico (37°C per 5'), per permettere l'ingresso del vettore nella cellula batterica. Le cellule vengono successivamente incubate 30' in terreno liquido a 37°C al fine di fornire loro il tempo necessario a produrre la β-lattamasi necessaria per crescere su terreno selettivo arricchito di ampicillina. I batteri sono stati piastrati su piastre Petri contenenti 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 specifici disegnati su caspasi-10 C10FLAG-C10NcoI-Rev per le colonie *wild-type* e C10HA-C10NcoI-Rev per quelle mutate.

## **6.10-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 in presenza di appropriate condizioni di pH e di forza ionica. 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 come spiegato nel capitolo dedicato all'estrazione di DNA genomico.

Il plasmide estratto è stato successivamente sequenziato per controllare che non vi fossero mutazioni nella porzione codificante C10 WT e MUT.

## **7-ANALISI FUNZIONALI DELLA MUTAZIONE**

### **7.1-Trasfezione transiente nella linea cellulare 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 CO<sub>2</sub> 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. 24 µg di DNA sono stati diluiti in 1,5 ml di terreno Opti-MEM (terreno consigliato per ottenere un'alta efficienza di trasfezione) e lasciati incubare a temperatura ambiente per 5'. Contemporaneamente 60 µl di Lipofectamina 2000 sono stati diluiti in 1.5 ml 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 pcDNA3.1(+) contenente il frammento di caspasi-10 WT, (B) il vettore con inserito il frammento di caspasi-10 MUT e (C) il vettore vuoto (mock) come controllo della trasfezione. Gli esperimenti di cotrasfezione, utilizzati per verificare l'effetto dominante negativo della forma mutata sulla *wild-type*, sono stati eseguiti trasfettando i plasmidi in modo tale da mantenere invariata la quantità totale di DNA trasfettato. Le differenti condizioni di trasfezione sono riportate nella seguente tabella:

CONDIZIONI	pcDNA	pcDNA+C10WT(FLAG)	pcDNA+C10MUT(HA)
1	24µg	\	\
2	\	24µg	\
3	\	\	24µg
4	\	12µg	12µg

**Tabella 3.** Condizioni di trasfezione dei costrutti pcDNA, pcDNA+C10WT (con l'epitopo FLAG) e pcDNA+C10MUT (con l'epitopo HA)

## 7.2-Western Blot

Le cellule sono state lisate per estrarne le proteine totali, risospingendole in 300-350 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.

Gli anticorpi utilizzati nell'analisi delle proteine sono stati: l'anticorpo policlonale  $\alpha$ -HA (Sigma), l'anticorpo monoclonale  $\alpha$ -FLAG (Sigma), l'anticorpo monoclonale  $\alpha$ -caspasi-10 (MBL) e, per verificare che la quantità di proteina caricata in ciascun pozzetto fosse confrontabile, l'anticorpo monoclonale anti-tubulina (Sigma).

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

## RISULTATI

### 1- Caratterizzazione dei pazienti con ALPS

I pazienti con ALPS vengono classificati sulla base delle mutazioni in geni noti per avere un ruolo nello sviluppo della malattia, quali Fas (ALPS-Ia), FasL (ALPS-Ib) e caspasi-10 (ALPS-II). I pazienti che non presentano mutazioni nei suddetti geni, ma che soddisfano i criteri clinici-laboratoristici necessari per la diagnosi, rientrano nel gruppo detto ALPS-III, in cui i geni coinvolti nella patogenesi sono attualmente sconosciuti.

In collaborazione con il Dipartimento di Pediatria di Torino abbiamo reclutato 42 pazienti con diagnosi clinica di ALPS e, al fine di permetterne una corretta classificazione, abbiamo sequenziato i geni di Fas, FasL e caspasi-10. Abbiamo identificato per la prima volta 2 pazienti con variazioni sia nel gene di caspasi-10, sia nel gene di Fas (Tabella 4).

PAZIENTE	GENE	SOSTITUZIONE NUCLEOTIDICA	ESONE/ INTRONE	SOSTITUZIONE AMINOACIDICA
Pz1	CASP10	1502 C>T	10	P501L
Pz2	CASP10	1337 A>G	9	Y466C
Pz1	FAS	IVS3-2 A>G	IVS3	Possibile skipping dell'esone 4
Pz2	FAS	139 C>T	2	Q47X

**Tabella 4. Caratterizzazione dei pazienti con ALPS.** Sequenziando il DNA genomico di 42 pazienti sono stati identificati 2 pazienti mutati sia in caspasi-10 sia in Fas.

#### 1.1-Quadro clinico

Il paziente-1 (Pz1) è un maschio di origine caucasica di 27 anni. All'età di 23 anni presentava febbre di origine sconosciuta associata a mucosite, perdita di peso e sudorazione notturna. A livello clinico il paziente presentava linfadenopatie laterocervicali, ascellari ed inguinali con conseguente epatosplenomegalia. Le analisi del sangue rilevavano ridotti livelli di globuli bianchi e piastrine e livelli di emoglobina appena al di sopra del valore di normalità; il paziente era inoltre positivo al test di Combs, presentava ipergammaglobulinemia ed espansione periferica di linfociti T TCR  $\alpha\beta^+$  doppi-negativi (DN) (6% dei PBMC). L'analisi istopatologica dei linfonodi dell'ascella sinistra mostrava iperplasia follicolare reattiva con regolare distribuzione di aree T e B- dipendenti. Inoltre la difettiva apoptosi Fas-mediata dei linfociti aveva

permesso la diagnosi di ALPS. La somministrazione di steroidi per via orale ha migliorato il quadro clinico, permettendo la riduzione delle dimensioni di milza e linfonodi e aumentando i livelli di piastrine ed emoglobina.

Il paziente-2 (Pz2) è un maschio di origine caucasica di 12 anni, che mostra fenotipo ALPS dall'età di 3 anni, con linfadenopatia laterocervicale, leggera epatosplenomegalia, neutropenia immune e trombocitopenia. L'esame istopatologico dei linfonodi sotto-mascellari mostrava iperplasia follicolare. Il paziente presentava espansione periferica di linfociti T doppi-negativi (3.6%) e difettiva apoptosi Fas mediata. L'analisi del sangue rilevava inoltre alti livelli di IgM e IgA. All'età di 4 anni aveva sviluppato una leggera anemia emolitica; le condizioni ematologiche migliorarono spontaneamente a 5 anni, ma all'età di 10 anni il paziente fu sottoposto ad un intervento chirurgico per l'asportazione dei linfonodi sotto-mascellari e cervicali che comprimevano le vie aeree superiori. Il paziente ad oggi presenta ancora linfadenopatie laterocervicali.

## **2- Analisi delle mutazioni nei geni TNFRSF6 e CASP10.**

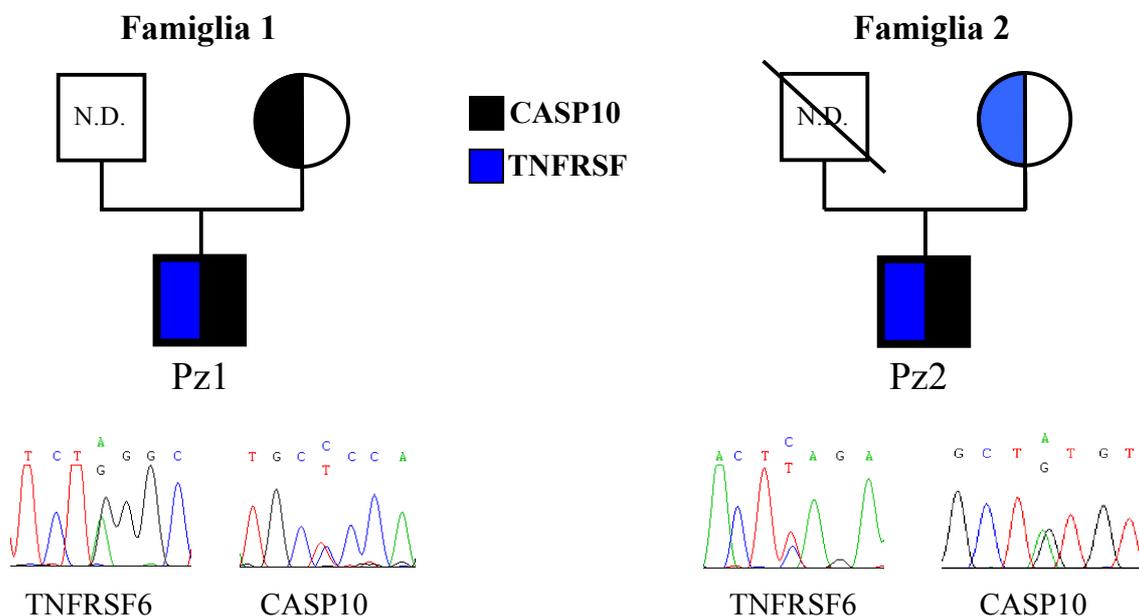
Il paziente-1 porta in eterozigosi una sostituzione nucleotidica nel gene TNFRSF6 (c334-2A>G, RefSeq NM\_000043.3) localizzata a livello del sito accettore di splicing nel terzo introne (IVS3-2A>G). La mutazione comporta lo “*skipping*” dell'esone 4, codificante per un dominio extracellulare “*cysteine-rich*”, lo slittamento della cornice di lettura con formazione di uno stop prematuro a livello del codone 38. L'allele mutato non codifica per alcuna proteina. Questa mutazione è già stata precedentemente descritta in omozigosi in un paziente ALPS, i cui genitori eterozigoti risultavano essere sani (Liu et al. 1995; Kasahara et al 1998).

Il paziente-1 è anche portatore in eterozigosi della variazione nucleotidica C1502T nell'esone 10 del gene di caspasi-10 (RefSeq NM\_032977.2), variazione che comporta la sostituzione a livello proteico della prolina in posizione 501 (P501L) con una leucina nella subunità piccola della caspasi. Al fine di valutarne la frequenza nella popolazione sana, si è proceduto a sequenziare il gene di caspasi-10 in 80 donatori sani per un totale di 160 alleli. In nessuno dei soggetti di controllo e degli altri 41 pazienti ALPS è stato possibile identificare la variazione, che essendo rappresentata con una frequenza inferiore all'1%, può pertanto essere definita una mutazione.

L'analisi familiare mostra che la mutazione in CASP10 è stata ereditata dal paziente dalla madre sana, che non è invece portatrice della mutazione in TNFRSF6.

Quest'ultima è stata probabilmente ereditata dal padre, non disponibile per l'analisi, oppure si tratta di una mutazione *de novo* (figura 7).

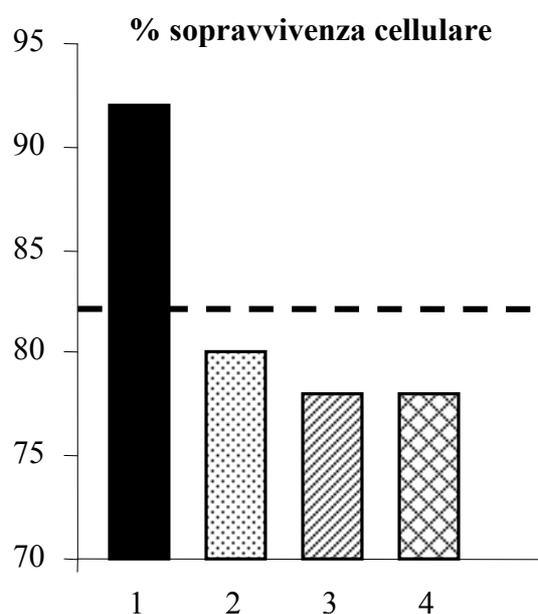
Il paziente-2 porta in eterozigosi la variazione C139T nel gene di Fas. Questa variazione cade nell'esone 2 del gene codificante per il dominio extracellulare e causa la formazione di un codone di stop prematuro (Q47X). La mutazione potrebbe causare aploinsufficienza dovuta alla degradazione dell'mRNA aberrante, fenomeno definito "*nonsense mediated decay of RNA*" oppure potrebbe generare una forma solubile di Fas. Il paziente-2 è risultato essere portatore in eterozigosi anche della variazione A1337G nel gene di caspasi-10. La variazione è localizzata nell'esone 9 del gene e causa la sostituzione aminoacidica Y446C nella subunità piccola della proteina. Questa variazione è stata precedentemente associata all'ALPS, ma viene rilevata anche nella popolazione caucasica sana con una frequenza allelica tra 1,6% e 2% (Zhu et al. 2006; Campagnoli et al. 2006). L'analisi familiare mostra che la mutazione in Fas viene ereditata dal paziente dalla madre apparentemente sana, mentre la mutazione in CASP10 potrebbe derivare dal padre, non disponibile per questo studio (figura 7).



**Figura 7. Alberi genealogici della famiglia 1 e della famiglia 2.** Ereditarietà delle mutazioni nei geni di CASP10 e TNFRSF6 e rispettivi elettroferogrammi delle sequenze effettuate su DNA genomico estratto da pazienti e familiari. I cerchi rappresentano le femmine, i quadrati i maschi. Soggetti portatori di mutazioni in CASP10 sono evidenziati in nero, mentre soggetti mutati in Fas sono evidenziati in blu; N.D.: non disponibile.

### 3-Analisi funzionale delle mutazioni.

L'analisi della funzionalità di Fas sui linfociti T attivati con PHA dei pazienti e delle rispettive madri mostra un'attività difettiva del recettore nel paziente-1 e "borderline" nel paziente-2, in quanto la sopravvivenza cellulare dopo stimolo con Fas risulta essere del 92% nel primo e del 78% nel secondo (valori normali: mediana 60%, 95<sup>th</sup> percentile 82%). La funzionalità di Fas è risultata essere "borderline" in entrambe le madri: la sopravvivenza cellulare era dell'80% nella madre del paziente-1 e del 78% nella madre del paziente-2 (Figura 8).

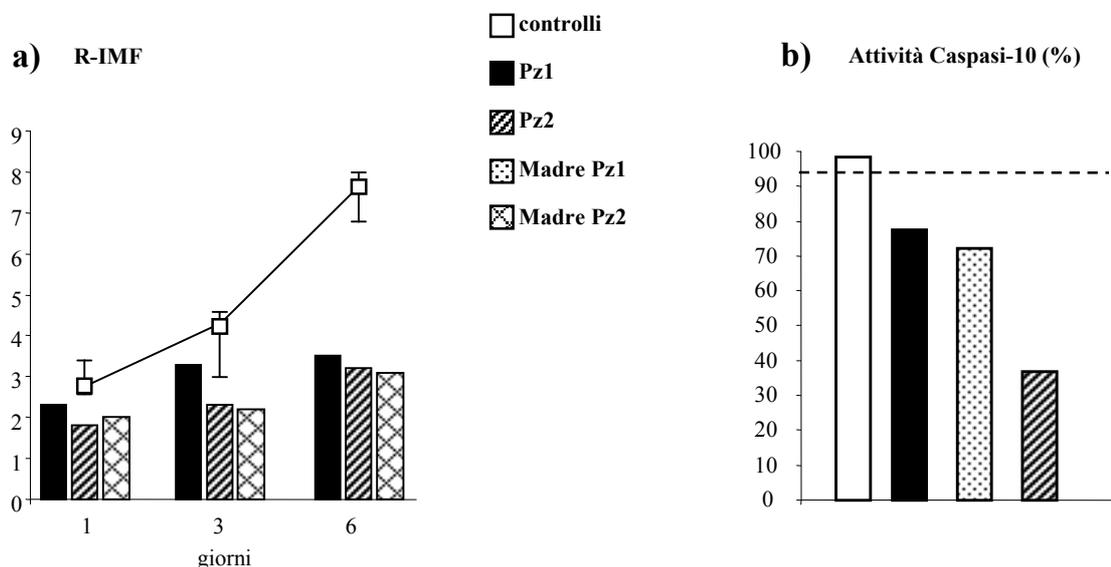


**Figura 8. Saggio di sopravvivenza cellulare.** La morte cellulare indotta dalla stimolazione di Fas è stata valutata su linee linfocitarie T ottenute da PBMCs attivati con 1 µg/ml (t=0) e 0.1 µg/ml (t=12) di PHA e coltivate in RPMI 1640 + 10% FBS + 2U/ml di rIL-2 (Sigma-Aldrich corporation, St Louis, Missouri). La funzione di Fas è stata valutata a 6 giorni dalla seconda stimolazione (t=21 di coltura).

Le cellule sono state incubate con terreno di controllo o con un terreno contenente un anticorpo monoclonale agonista anti-Fas (1 µg/ml - CH11, isotipo IgM-Upstate Charlottesville, VA, USA) in presenza di rIL-2 (1U/ml). Le cellule di due controlli sani sono state incluse in tutti i test come controlli positivi. I risultati sono stati espressi come sopravvivenza cellulare relativa percentuale, calcolati secondo la seguente formula: (cellule vive dopo stimolo apoptotico/cellule vive non trattate) x 100. La linea tratteggiata indica il 95<sup>th</sup> percentile 82%). 1) Pz1, 2) Madre Pz1, 3) Pz2, 4) Madre Pz2.

Per valutare se le mutazioni IVS3-2A>G e Q47X in TNFRSF6 comportassero difetti di espressione della proteina, questa è stata valutata con immunofluorescenza diretta sui linfociti T dei pazienti-1 e -2 e della madre del paziente-2 tramite citofluorimetria. I risultati mostrano una riduzione dell'espressione di Fas in entrambi i pazienti (Figura 9a).

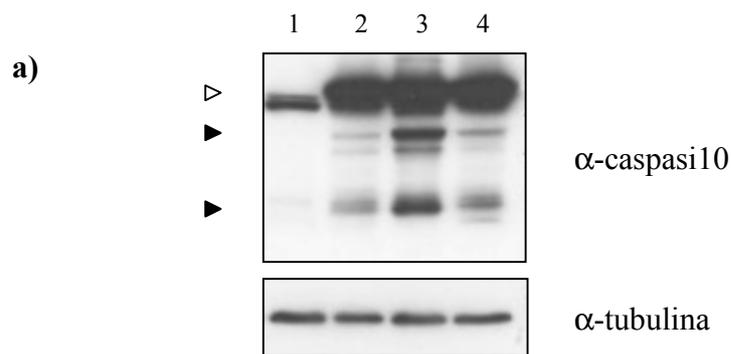
Per valutare se le sostituzioni aminoacidiche P501L e Y446C in caspasi-10 comportassero difetti sulla funzionalità dell'enzima, abbiamo valutato l'attività di caspasi-10 stimolando con un anticorpo anti-Fas i linfociti T dei soggetti mutati disponibili: Pz1, sua madre e Pz2. Tutti questi soggetti mostrano un'attività di caspasi-10 minore rispetto ai controlli (Figura 9b). Questi dati indicano che entrambe le sostituzioni causano un difetto nell'attività dell'enzima. I nostri dati sulla sostituzione Y446C sono in linea con quelli precedentemente riportati che mostrano come la caspasi-10<sup>Y446C</sup> clonata risulti essere meno efficace della forma *wild-type* nel ripristinare l'apoptosi Fas-mediata in linee cellulari che mancano di caspasi-8 e -10 endogene, pur non esercitando un'azione dominante negativa sulla *wild-type* (Zhu et al. 2006)



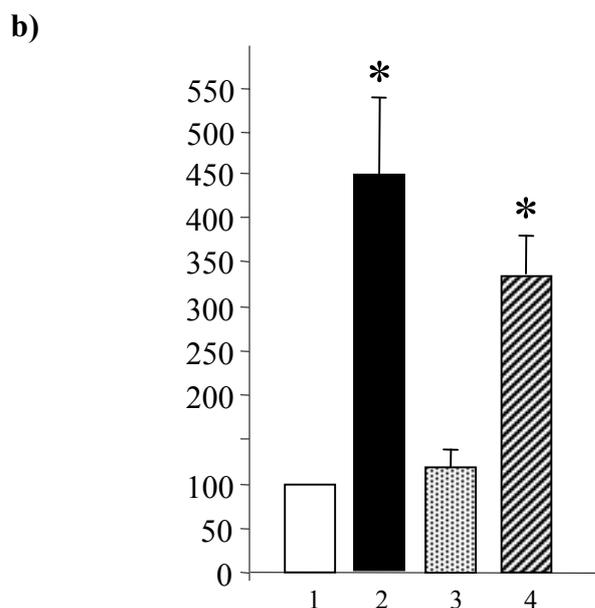
**Figura 9. Espressione di Fas e attività di caspasi-10 nei soggetti portatori delle mutazioni nei geni TNFRSF6 e CASP10.** a) L'espressione di Fas è stata valutata su linfociti T ottenuti attivando i PBMC con PHA (1 µg/ml) e coltivati per 6 giorni in RPMI 1640 +10% FCS+rIL-2 (2 U/mL). Prima dell'attivazione (giorno 0) e nei giorni 3 e 6 di coltura le cellule sono state mercate con anticorpo anti-Fas FITC-coniugato e analizzate tramite citofluorimetro. I numeri indicano il rapporto tra le intensità mediane di fluorescenza (R-IMF) di ciascuna marcatura. b) L'attività di caspasi-10 è stata valutata su linfociti T attivati con PHA e coltivati per 12 giorni in RPMI 1640 +10% FCS+rIL-2 (10 U/mL) e in seguito trattati o non con l'anticorpo anti-Fas per 3 ore. I risultati sono espressi come attività % relativa della caspasi calcolata: (risultato di ogni singolo soggetto/ media dei risultati di 2 controlli valutati nello stesso esperimento) X 100; la linea tratteggiata indica il 5<sup>th</sup> percentile dell'attività mostrata da tutti i controlli normali.

Per valutare ulteriormente l'effetto della sostituzione P501L del paziente-1 sulla funzionalità della proteina abbiamo clonato i cDNA codificanti per entrambe le forme (WT e MUT) nel vettore pcDNA 3.1, per effettuare una trasfezione transiente. Per distinguere le due forme, mutata e *wild-type*, sono stati aggiunti all'N-terminale di

ciascuna proteina due diversi epitopi (TAG) verso cui sono diretti anticorpi commerciali: FLAG, fuso alla caspasi-10 *wild-type* (WT<sup>FLAG</sup>) e HA fuso alla forma mutata (P501L<sup>HA</sup>). Abbiamo scelto di utilizzare come cellule recipienti le 293T, cellule di epitelio renale embrionale umano, in quanto presentano bassi livelli di caspasi-10 endogena. Inoltre la loro trasfezione con molecole pro-apoptotiche induce l'attivazione spontanea del processo apoptotico. Il primo passaggio è stato quello di verificare se i costrutti fossero in grado di esprimersi nelle cellule 293T e se le proteine codificate fossero funzionanti. E' stato quindi eseguito un Western Blot su estratti ottenuti da 293T trasfettate con il vettore vuoto (mock), con la sola forma *wild-type* e con la sola forma mutata. Le 293T sono state inoltre co-trasfettate con entrambi i costrutti P501L<sup>HA</sup> e WT<sup>FLAG</sup> per valutare se la forma mutata esercitasse un effetto dominante negativo sulla forma *wild-type*. Il Western Blot mostra che entrambi i costrutti vengono espressi a livelli comparabili e che entrambe le proteine vengono spontaneamente clivate; la forma mutata sembra essere clivata più efficientemente della forma *wild-type* (Figura 10a). L'analisi dell'attività della caspasi-10 valutata sui lisati delle cellule trasfettate indica però che la forma mutata ha un'attività molto ridotta rispetto alla forma *wild-type* (circa il 50%). Nelle cellule co-trasfettate con P501L<sup>HA</sup> e WT<sup>FLAG</sup>, l'attività di caspasi-10 risulta essere intermedia tra quella delle cellule trasfettate con i singoli costrutti; questo indica che la forma mutata P501L non esercita attività dominante negativa sulla *wild-type* (Figura 10b).



**Attività caspasi-10 (%)**



**Figura 10. Attività di caspasi-10 nelle cellule 293T trasfettate con caspasi-10 mutata (P501L) e *wild-type*.** A) Western blot sui lisati di 293T trasfettate con anticorpo anti-caspasi-10; la freccia bianca indica la pro-caspasi-10, mentre le frecce nere indicano le forme clivate. L'espressione delle molecole trasfettate è stata valutata anche con gli anticorpi anti-HA e anti-FLAG. b) Saggio fluorimetrico dell'attività di caspasi-10 valutata sui lisati di cellule trasfettate (24h); i risultati sono relativi al valore di attività delle cellule trasfettate con il solo vettore vuoto (mock) (100% di attività) e rappresentano la media e l'errore standard dei dati di 6 esperimenti indipendenti. Gli asterischi indicano i dati significativamente differenti rispetto a quelli ottenuti su cellule trasfettate con P501L<sup>HA</sup> ( $p < 0.01$  Mann Whitney test). 1) trasfezione con pcDNA (mock), 2) trasfezione con costrutto pcDNA-C10WT (FLAG); 3) trasfezione con costrutto pcDNA-C10MUT (HA); 4) trasfezione con costrutti pcDNA-C10WT (FLAG)+ pcDNA-C10MUT (HA).

## DISCUSSIONE

I pazienti con sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS) sono portatori di difetti funzionali a carico del sistema Fas/FasL e sviluppano malattie autoimmuni e linfoproliferazione non neoplastica con linfadenopatia e/o splenomegalia e eventuale espansione di linfociti T doppi negativi per CD4 e CD8 (DN) (Fisher et al. 1995; Straus et al. 1999; Rieux-Leucat et al. 1995; Drappa et al. 1996; Bettinardi et al. 1997; Fleisher et al. 2001). Diverse evidenze suggeriscono che l'ALPS sia geneticamente eterogenea: in differenti famiglie possono essere coinvolti geni diversi e alterazioni geniche multiple possono essere necessarie per lo sviluppo della malattia. Ad oggi sono stati identificati tre possibili geni associati alla malattia, ma la loro mutazione è presente solamente in una minoranza di pazienti e permette di individuare i sottotipi di malattia ALPS-Ia (mutazione di Fas), ALPS-Ib (mutazione di FasL) e ALPS-II (mutazione di caspasi-10). I rimanenti pazienti sono classificabili per esclusione nel sottotipo di malattia ALPS-III, dovuto a mutazioni in geni non noti. Recentemente, mutazioni nel gene di NRAS sono state associate allo sviluppo di un altro tipo di ALPS (ALPS IV) (Oliveira et al 2007).

Generalmente la mutazione è presente in eterozigosi, ma da sola non è sufficiente per lo sviluppo della malattia, come dimostrato dal fatto che il genitore portatore della mutazione è in genere sano; entrambi i genitori di questi pazienti presentano deficit funzionali nell'apoptosi Fas-mediata, il che suggerisce che entrambi siano portatori di alterazioni geniche responsabili del difetto apoptotico, ma non sufficienti per determinare lo sviluppo della malattia; questa richiederebbe pertanto la cotrasmissione di entrambe le alterazioni geniche al figlio.

Questo lavoro suggerisce che mutazioni nel gene TNFRSF6, che caratterizzano l'ALPS-Ia e mutazioni in CASP10, tipiche dell'ALPS-II possono cooperare nello sviluppo della malattia. Le mutazioni in Fas sono le più frequenti nell'ALPS. Normalmente sono mutazioni eterozigoti e la loro penetranza dipende dall'effetto sulla funzionalità del recettore stesso. Le mutazioni più severe sono nella maggior parte dei casi quelle che cadono nel "death domain" intracellulare, coinvolto nel reclutamento di FADD e di caspasi-8 e -10, molecole che danno inizio al segnale di morte. Queste mutazioni esercitano un effetto dominante negativo e sono caratterizzate da un'elevata penetranza. Al contrario, mutazioni che colpiscono la porzione extracellulare del recettore possono causare aploinsufficienza oppure sono caratterizzate da una bassa penetranza (Jackson et al. 1999; Rieux-Laucat et al. 1999).

Entrambi i nostri pazienti sono portatori di mutazioni che probabilmente causano aploinsufficienza. In linea con questa ipotesi, i linfociti T sia del Pz-1 che del Pz-2 esprimono bassi livelli di Fas. La penetranza di queste mutazioni dovrebbe essere bassa. Questo è vero per la mutazione nonsense Q47X; la madre del Pz-2, portatrice della sostituzione non ha infatti alcun segno clinico di ALPS. La stessa analisi non può essere estesa alla famiglia 1; non abbiamo potuto valutare l'effetto della sostituzione IVS3-2A>G sul padre del Pz-1 probabilmente portatore della mutazione in quanto non disponibile per l'analisi. Questa stessa mutazione è stata però precedentemente descritta in un'altra famiglia, in cui viene dimostrato che la sostituzione in eterozigoti non è sufficiente a causare l'ALPS (Kasahara et al. 1998).

Ad oggi sono note solo due mutazioni a carico del gene di CASP10 coinvolte nello sviluppo dell'ALPS. Si tratta di mutazioni missenso che causano le sostituzioni aminoacidiche L285F e I406L, trovate rispettivamente in 1 e 3 pazienti eterozigoti. Entrambe le mutazioni comportano una diminuzione dell'attività di caspasi-10 esercitando un effetto dominante negativo sulla forma *wild-type* della proteina. Nessuna delle due mutazioni è però sufficiente a causare da sola lo sviluppo della malattia, in quanto soggetti portatori della sostituzione appartenenti alla stessa famiglia risultano essere sani (Wang et al. 1999; Zhu et al. 2006).

Le sostituzioni riscontrate nei nostri pazienti sono mutazioni missenso in eterozigosi che diminuiscono l'attività di caspasi-10 senza però esercitare un effetto dominante negativo sulla proteina *wild-type*. Questi pazienti sono inoltre portatori di mutazioni in Fas con bassa penetranza, mutazioni che concorrono allo sviluppo del difetto apoptotico e quindi dell'ALPS. Il paziente-2 è portatore della sostituzione Y446C in CASP10, mutazione già descritta in un altro paziente eterozigote con una forma leggera di ALPS (Zhu et al. 2006). Questa mutazione diminuisce la funzionalità di caspasi-10, senza esercitare un effetto dominante negativo sulla proteina *wild-type*. La mutazione non è sufficiente a causare lo sviluppo dell'ALPS in quanto è stata anche trovata nell'1-2% della popolazione caucasica sana (Zhu et al. 2006; Campagnoli et al. 2006). Il paziente-1 è portatore della nuova mutazione P501L, localizzata così come la Y446C, nella subunità piccola di caspasi-10. La mutazione P501L causa anch'essa un deficit dell'attività di caspasi-10, senza però indurre un effetto dominante negativo. Entrambi i pazienti presentano un deficit di attività dell'enzima nei linfociti T; anche la madre del paziente-1, portatrice della sola sostituzione P501L presenta lo stesso difetto. Inoltre,

L'attività di caspasi-10 valutata sui lisati delle 293T trasfettate con la forma mutata P501L risulta essere circa il 50% rispetto a quella valutata sui lisati delle cellule trasfettate con la forma *wild-type*. Esperimenti di co-trasfezione di forma mutata e *wild-type* dimostrano la mancanza di dominanza negativa della mutazione, in quanto si ha un effetto additivo e non antagonistico delle due forme nel saggio di attività dell'enzima. E' importante sottolineare dall'analisi del Western Blot che la mutazione P501L non comporta un difetto nel taglio proteolitico della caspasi-10, taglio proteolitico che viene spesso interpretato come segno di attivazione. La diminuzione di attività rilevata nel saggio fluorimetrico *in vitro* supporta l'ipotesi di Boatright et al. secondo cui il clivaggio non è sufficiente nè necessario per l'attivazione delle caspasi iniziatrici, attivazione che dipende prevalentemente dalla loro dimerizzazione (Boatright et al. 2003).

L'effetto dell'interazione tra queste mutazioni in Fas e caspasi-10 sembra in questo lavoro essere opposto a quello riportato dell'interazione tra mutazioni in Fas e la variazione missenso V410I (Wang et al. 1999; Zhu et al. 2006). Inizialmente si pensava che questa variazione fosse sufficiente a causare ALPS in un paziente omozigote. Al contrario viene recentemente considerata un polimorfismo "innocente" della proteina riscontrato nel 3-5% della popolazione caucasica sana (Wang et al. 1999; Zhu et al. 2006; Gronbaek et al. 2002). Un'analisi di associazione inoltre sostiene che questa sostituzione abbia un effetto protettivo contro lo sviluppo di ALPS in 63 famiglie con ALPS-Ia dovuto a severe mutazioni dominanti in Fas (Zhu et al. 2006). E' importante sottolineare che il primo paziente ALPS omozigote per la V410I in CASP10 era anche portatore in eterozigosi di una mutazione missenso nel gene TNFRSF1A (tumor necrosis factor receptor-1), spesso alterato nei soggetti affetti da TRAPS (TNF receptor-associated periodic fever syndrome), mutazione che spiegava il quadro clinico del paziente (Hull et al. 2002). Questo suggerisce che variazioni in caspasi-10 possono influenzare anche il fenotipo clinico dovuto a mutazioni in TNFRSF1A.

In conclusione questo lavoro suggerisce che l'ALPS può in alcuni casi essere causato dall'effetto concorrente di mutazioni che colpiscono differenti geni coinvolti nella funzionalità di Fas e che può, in alcuni casi essere considerato una malattia monogenica quando causato da mutazioni severe ed in altri essere considerato digenica o oligogenica quando sono presenti mutazioni che colpiscono più livelli della via di trasduzione Fas-mediata.

## BIBLIOGRAFIA

- 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.
- Adams J.M., Cory S. The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326, 1998.
- Afford S, Randhawa S. Apoptosis. *Mol Pathol.* 53(2), 55-63, 2000.
- Amsen D., Kruisbeek A.M. Thymocyte selection: not by TCR alone. *Immunol. Rev.* 165, 209-229, 1998.
- Ashkenazi A., Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308, 1998.
- Baker S.J., Reddy E.P. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17, 3261-3270, 1998.
- Bancherau J., Steinmann R.M. Dendritic cells and the control of immunity, *Nature* 392, 245-252, 1998.
- 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.
- Blessing J.J., Brown M.R., Dale J.K., Straus S.E., Lenardo M.J. et al. TCR- $\alpha/\beta$ + CD4-CD8- T cells in humans with the autoimmune lymphoproliferative syndrome express a novel CD45 isoforms that in analogous to murine B220 and represents a marker of altered O-Glycan biosynthesis. *Clin. Immunol.* 100, 314-324, 2001.
- Blink E.J., Trapani J.A., Jans D.A. Perforin –dependent nuclear targeting of granzymes: a central role in the nuclear events of granul-exocytosis-mediated apoptosis? *Immunol. Cell Biol.* 77(3), 206-215, 1999.
- Boatright K.M., Renshaw M., Scott F.L., Sperandio S., Shin H., Pederson I., Ricci J.E., Edris W.A., Sutherland D.P., Green D.R. et al. A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell* 11: 1-20, 2003.
- Boise LH, Noel PJ, Thompson CB. CD28 and apoptosis. *Curr. Opin. Immunol.* Oct;7(5):620-625, 1995.
- Bossy-Wetzell E., Green D.R. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mut. Res.* 434, 243-251, 1999.
- Campagnoli MF, Garbarini L, Quarello P, et al. The broad spectrum of autoimmune lymphoproliferative disease: molecular bases, clinical features and long-term follow-up in 31 patients. *Haematologica.* 2006;91:538-41.
- Chai J., Wu Q., Shiozaki E., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Shi Y. Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: Mechanisms of activation and substrate binding. *Cell* 107: 399-407, 2001.
- Chambers C.A., Sullivan T.J., Allison J.P. Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells. *Immunity* 7, 885-895, 1997.
- 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.

- Chun H.J., Zheng L., Ahmad M., Wang J., Speirs C.K., Siegel R.M., Dale J.K., Puck J., Davis J., Hall C.G. et al. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419: 395-399, 2002.
- Craxton A., Otipoby K.L., Jiang A., Clark E.A. Signal transduction pathways that regulate the fate of B lymphocytes. *Adv. Immunol.* 73, 79-152, 1999.
- De Maria R., Lenti L., Malisan F. et al. Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science* 277, 1652-1655, 1997.
- Desagher S, J.C. Martinou, Mitochondria as the central control point of apoptosis, *Trend in Cell Biology* 10 , 2001.
- Deveraux Q.L., Reed J.C. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Gene Dev.* 13, 239-252, 1999.
- Dianzani U, Bragardo M, DiFranco D Alliaudi C, Scagni P, Buofiglio D, Redoglia V, Bonissoni S, Corraera A, Dianzani I, Ramenghi U. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferations. *Blood* 89:2871-2879, 1997.
- Djeu J.Y, Jiang K., Wei S. A view to a kill: signal triggering cytotoxicity. *Clin. Cancer Res.* 8(3), 636-640, 2002.
- Drappa J., Vaishnav A.K., Sullivan K.E. et al. Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N. Eng.l J. Med.* 335, 1643-1649, 1996.
- Fernandes-Alnemri T., Armstrong R.C., Krebs J., Srinivasula S.M., Wang L., Bullrich F., Fritz L.C., Trapani J.A., Tomaselli K.J., Litwack G., Alnemri E.S. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc. Acad. Nat. Sci. USA* 93: 7464-7469, 1996.
- 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.
- 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.
- Frauwirth K.A., Thompson C.B. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J. Clin. Invest.* 109(3), 295-299, 2002.
- Fuss I.J., Strober W., Dale J.K., Fritz S., Peaarlstein G.R. et al. Characteristic T helper 2 T cell cytokine abnormalities in autoimmune lymphoproliferative syndrome, a syndrome marked by defective apoptosis and humoral autoimmunity. *J. Immunol.* 158: 1912-1918, 1997.
- 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.
- Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312, 1998.
- 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.
- Griffith T.S., Lynch D.H. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 559-563, 1998.

- Gronbaek K., Dalby T., Zeuthen J., Ralfkiaer E., Guldberg P. The V410I (G1228A) variant of the caspase-10 gene is a common polymorphism of the Danish population. *Blood* 95: 2184-2185, 2000.
- Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J. BCL-2 family members and mitochondria in apoptosis. *Gen. Dev.* 13, 1899-1911, 1999.
- Guo M and Hay B.A. Cell proliferation and apoptosis. *Curr. Opin. in Cell Biol.* 11, 745-752, 1999.
- Hengartner M.O. The Biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 2000.
- 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.
- Holzelova E., Vonarbourg C., Stolzenberg M.C., Arkwright P.D., Selz F. et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations *N. Engl. J. Med.* 351: 1409-1418, 2004.
- Hu Y., Benedict M.A., Wu D. et al. 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.
- Hull KM, Drewe E, Aksentijevich I, Singh HK, Wong K, McDermott EM, Dean J, Powell RJ, Kastner DL. The TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS): emerging concepts of an autoinflammatory disorder. *Medicine (Baltimore)* 81:349-68, 2002.
- Jackson CE, Fischer RE, Hsu AP, Anderosn SM, Choi Y, Wang J, Dale JK, Fleisher TA, Middleton LA, Sneller MC, Lenardo MJ, Straus SE, Puck JM. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance. *Am J Hum Gen* 64:1002-1014, 1999.
- Juo P., Kuo C.J., Yuan J., Blenis J. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.* 8: 1001-1008, 1998.
- Kang B.H., Ko E., Kwon O.K., Choi K.Y. The structure of procaspase 6 is similar to that of active mature caspase 6. *Biochem. J.* 364: 629-634, 2002.
- Kasahara Y, Wada T, Niida Y, et al. Novel Fas (CD95/APO-1) mutations in infants with a lymphoproliferative disorder. *Int Immunol.* 1998;10:195-202.
- Kischkel F.C., Lawrence D.A., Tinel A., LeBlanc H., Virmani A., Schow P., Gazdar A., Blenis J., Arnott D., Ashkenazi A. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J. Biol. Chem.* 276: 46639-46646, 2001.
- Kluck R.M., Bossy-Wetzell E., Green D.R., Newmeyer D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136, 1997.
- Krammer P.H. CD95's deadly mission in the immune system, *Nature* 407, 12, 2000.
- Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssiere J.C., Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* 9, 1277-1287, 1995.
- Kroemer G., Reed J.C. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 6, 513-519, 2000.
- 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.

- Kumar S. Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Diff.* 6, 1060-1066, 1999.
- Ledgerwood E.C., Pober J.S., Bradley J.R. Recent advances in the molecular basis of TNF signal transduction. *Lab. Invest.* 79, 1041-1050, 1999.
- Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94(4), 491-501, 1998.
- 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.
- Liu C, Cheng J, Mountz JD. Differential expression of human Fas mRNA species upon peripheral blood mononuclear cell activation. *Biochem J.* 1995;310:957-63.
- Lopaun U., Yao X., Williams R.K., Blessing J.J., Dale J.K. et al. Increases in circulating and lymphoid tissue interleukin-10 in autoimmune lymphoproliferative syndrome are associated with disease expression. *Blood* 97: 3161-3170, 2001.
- Los M, C. Stroh, R. U. Janiche, I. H. Engels, K. Schulze-Osthoff. Caspases: more than just killers? *Trends in Immunology* Vol.22 No.1, 2001.
- Luo X. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490, 1998.
- Martinon F. and Tschopp J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 117: 561-574, 2004.
- Medema J.P, 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 10: 2794-2804, 1997.
- Mitti P.R., Di Marco S., Krebs J., Bai X., Karanewsky D.S., Priestle J.P., Tomaselli K.J and Grutter M.G. Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide Acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. *J. Biol. Chem.* 272: 6539-6547, 1997.
- Mountz J.D., Cheng J., Su X., Wu J., Zhou T. Autoimmunity, apoptosis defects and retroviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 374, 183-201, 1995.
- Müllauer L, Gruber P., Sebinger D., Buch J., Wohlfart S., Chott A. Mutations in apoptosis gene: a pathogenetic factor for human disease. *Mutation Research* 488, 211-231, 2001.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365, 1997.
- Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* 33, 29-55, 1999.
- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 267,1449-1456, 1995.
- O'Connell J., Bennett M.W., O'Sullivan G.C., Collins J.K., Shanahan F. Fas counter-attack\_the best form of tumor defense? *Nat. Med.* 5, 267-268, 1999.
- 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.
- Oliveira JB, Bidere N, Niemela JE, Zheng L, Sakai K, Nix CP, Danner RL, Barb J, Munson PJ, Puck JM, Dale J, Straus SE, Fleisher TA, Lenardo MJ. NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:8953-8, 2007.

- Pinkosky M.J., Green D.R. Fas ligand, death gene. *Cell Death Diff.* 6, 1174-1181, 1999.
- Pop C., Chen Y.R., Smith B., Bose K., Bobay B., Tripathy A., Franzen S., Clark A.C. Removal of the pro-domain does not affect the conformation of the procaspase 3 dimer. *Biochemistry* 40: 14224-14235, 2001.
- Raff M.C. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356(6368), 397-400, 1992.
- Ravirajan C.T., Pittoni V., Isenberg D.A. Apoptosis in human autoimmune disease. *Int. Rev. Immunol.* 18, 563-589, 1999.
- Reed J.C. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17, 3225-3236, 1998.
- Ricci-Vitiani L., Conticello C., Zeuner A., De Maria R. CD95/CD95L interactions and their role in autoimmunity. *Apoptosis* 5(5), 419-424, 2000.
- Rieux-Laucat F, Blachere S, Danielan S, De Villartay JP, Oleastro M, Solary E, Bader-Meunier B, Arkwright P, Pondar C, Bernaudin F, Chapel H, Nielsen S, Berrai M, Fischer A, Le Deist F. Lymphoproliferative syndrome with autoimmunity: a possible genetic basis for dominant expression of the clinical manifestations. *Blood* 94:2575-82, 1999.
- Rieux-Leucat F, Le Deist F, Hivroz C, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268:1347-1349, 1995.
- Schendel S.L., Montal M., Reed J.C. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Diff.* 5, 372-380, 1998.
- Schulte-Hermann R., Bursch W., Grasl-Kraupp B., Torök L., Ellinger A., Müllauer L. Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* 82/83, 143-148, 1995.
- Sebzda E. et al. Selection of the T cell repertoire. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 829-874, 1999.
- 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.
- Sharma K., Wang R.X., Zhang L.Y., Yin D.L., Luo X.Y., Solomon J.C., Jiang R.F., Markos K., Davidson W., Scott D.W., Shi Y.F. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol. Ther.* 88(3), 333-347, 2000.
- Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr. Opin. Immunol.*;10(5):581-7, Oct 1998.
- Shiozaki E.N., Chai J., Rigotti D.J., Riedl S.J., Li P., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Fairman R., Shi Y. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell* 11: 519-527, 2003.
- 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.
- Slee E.A., Adrian C., Martin S.J. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Diff.* 6, 1067-1074, 1999.
- Sneller M.C., Dale J.K., Straus S.E. Autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Curr. Opin. Immunol.* 15: 325-331, 2003.
- Sprick M.R., Rieser E., Sthal H., Grosse-Wilde A., Weigand M.A., Walczak H. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-

- inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J.* 21: 4520-4530, 2002.
- Straus S.E., Jaffe E.S., Puck J.M., Dale J.K., Elkon K.B., Rosen-Wolff A., Peters A.M.J., Sneller M., Hallahan C.W., Wang j., Fischer R.E., Jackson C.M., Lyn A.Y., Baumler E., S., Marx A., Vaishnav A.K., Grodzicky T., Fleisher T.A., Lenardo M.J. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 98, 194-199, 2001
  - Straus S.E., 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.
  - Talanian R.V., Dang L.C., Ferez C.R., Hackett M.C., Mankovich J.A., Welch J.P., Wong W.W., Brady K.D. Stability and oligomeric equilibria of refolded interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 271: 21853-21858, 1996.
  - Thornberry N.A., Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316, 1998.
  - Trapani JA, Sutton VR, Smyth MJ. CTL granules: evolution of vesicles essential for combating virus infections. *Immunol. Today* 20(8):351-6, Aug 1999.
  - Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J., Peng T., Jones D.P., Wang X. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132, 1997.
  - Van Der Werff Ten Bosch J, Otten J, Thielemans K. Autoimmune lymphoproliferative syndrome type III: an indefinite disorder. *Leuk. Lymphoma.* 41(1-2):55-65, 2001.
  - Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell.* 76(5), 777-779, 1994.
  - Vincenz C., Dixit V.M. Fas associated death domain protein interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme 2 (FLICE 2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95 e p55 mediated death signaling. *J. Biol. Chem.* 272, 6578-6583, 1997.
  - Vujanovic N.L. Role of TNF family ligands in antitumor activity of natural killer cells. *Int. Rev. Immunol.* 10(5), 415-437, 2001.
  - Wang J., Chun H.J., Wong W., Spencer D.M., Lenardo M.J. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 98: 13884-13888, 2001.
  - Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, Sneller M, Yao X, Puck JM, Straus SE, Lenardo MJ. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell.* 98(1):47-58, 1999.
  - Wong C.S., Arkwright P.D., Rieux-Leucat F., Cant A.J., Stevens R.F. et al. Childhood linear IgA disease in association with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Br. J. Dermatol.* 150: 578-580, 2004.
  - 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.
  - Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 68:251-306, 1980.

- Zhu S., Hsu A.P., Vacek M.M., Zheng L., Schaffer A.A., Dale J.K., Davis J., Fischer R.E., Straus S.E., Boruchov D., Saulsbury F.T., Lenardo M.J., Puck J.M. Genetic alterations in caspase-10 may be causative or protective in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Hum. Gen.* 2006.

## SEMINARI INTERNI AL DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

### LANNO

**18 Novembre 2005.** Cardiac potassium channel regulation by accessory subunits. Dott. Diego Cotella.

**23 Novembre 2005.** HCV-related steatosis: pathogenic mechanism and clinical implications. Prof. Luigi Elio Adinolfi.

**25 novembre 2005.** Mechanism of transcriptional regulation and disease. Prof. Robert Tjian.

**19 Gennaio 2006.** Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation. Prof.ssa Maria Grano.

**13 Febbraio 2006.** New perspectives in metabotropic glutamate receptors. Prof. Ferdinando Nicoletti.

**15 Febbraio 2006.** Anticorpi ricombinanti: un potente tool biotecnologico. Prof. Daniele Sblattero.

**13 Marzo 2006.** Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell'emofilia. Dott.ssa Atonia Follenzi.

**20 Marzo 2006.** The natural course of preclinical type 1 diabetes. Prof. Mikael Knip.

**6 Aprile 2006.** Aspetti immunogenetici e terapeutici della "hairy cell leukemia". Dott. Francesco Forconi.

**20 Aprile 2006.** Terapie molecolari nelle malattie mieloproliferative. Dott.ssa Daniela Cilloni.

**4 maggio 2006.** Il mesotelioma: un modello di terapia traslazionale. Dott. Luciano Mutti.

**18 Maggio 2006.** L'epatite autoimmune. Prof. Marco Lenzi.

**30 Maggio 2006.** Sperm mediated gene transfer: storia e applicazioni. Prof.ssa Marialuisa Lavitrano.

**15 Giugno 2006.** Melusin: a stretch sensor molecule controlling adaptive cardiac remodeling to pressure overload. Prof. Guido Tarone.

**27 Giugno 2006.** Osteointegrazione e superfici implantari. Prof.ssa Lia Rimondini.

**5 luglio 2006.** DNA and protein arrays in infectious diseases: from basic research to vaccine design. Dott.ssa Renata Grifantini.

**11 settembre 2006.** The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis. Prof. Dieter Bromm.

## II ANNO

- 10 gennaio 2007.** Gene silencing by RNA interference (RNAi). *Prof.ssa P. DeFilippi*
- 17 gennaio 2007.** Detection of miRNA target genes through statistical analysis of DNA motifs in human-mouse 3'-UTR regions. *Prof. M. Caselle*
- 18 gennaio 2007.** Patogenesi del Diabete Mellito di tipo 1: stiamo vincendo o stiamo perdendo? *Prof. GF Bottazzo*
- 1 febbraio 2007.** Gene therapy strategies for Phenylketonuria. *Prof. B. Thöny*
- 9 febbraio 2007.** Vita morte e miracoli dell'epatocita. *Prof. M Tripodi*
- 22 febbraio 2007.** Fragile X-syndrome from RNA metabolism impairment to spine dysmorphogenesis. *Prof. C. Bagni*
- 14 marzo 2007.** Protein microarrays development of new supports for improved sensisivity. *Dr. M. Cretich*
- 15 marzo 2007.** Colangiopatie autoimmuni. *Prof. M. Podda*
- 16 marzo 2007.** Microarrays di tessuti: una strategia per identificare nuovi biomarcatori tumorali. *Dott.ssa M. Capra*
- 29 marzo 2007.** Marcatori farmacogenetici nel carcinoma coloretale: quali prospettive per una terapia personalizzata? *Prof. E. Mini*
- 12 aprile 2007.** Relazione tra struttura e funzione delle proteine mediante analisi del protein database. *Prof. Milanesio*
- 16 maggio 2007.** Difetti genetici del pre-B cell receptor. *Prof. Ferrari*
- 25 maggio 2007**The regulation of hematopoietic stem cellsby SMAD signaling. *Dott. Karlsson*
- 28 maggio 2007.** Translating basic science into therapeutic strategies for Shwachmann Diamond Syndrome. *Dott. Ellis*
- 4 giugno 2007.** Sindromi autoinfiammatorie. *Prof. A Martini*
- 21 giugno 2007.** Bioinformatics tools for the analysis of UTRs and for the prediction of alternative splice site. *Prof. E Mignone*

## **CORSI FREQUENTATI**

**I ANNO:** corso di Inglese tenuto dal Prof. Irving Bell

## CONGRESSI FREQUENTATI

- XXVIII Congresso Nazionale della Società italiana di Patologia, Università degli studi di Pavia, 19-22 settembre 2006.
- XIV Telethon Convention, Palazzo dei Congressi, Salsomaggiore Terme, 12-14 Marzo, 2007.

## COMUNICAZIONI A CONGRESSI

**“Variazioni nel gene di perforina in pazienti con sclerosi multipla”.** Orilieri E., Cappellano G., Comi C., Chiocchetti A., Cerutti E., Castelli L., Monaco F., Dianzani U. (XXVIII Congresso Nazionale della Società italiana di Patologia, Università degli studi di Pavia, 19-22 settembre 2006). (POSTER)

**“Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function”.** Cappellano G., Chiocchetti A., Cerutti E., Ferretti M., Orilieri E., Dianzani I., Ramenghi U., Dianzani U. (16<sup>th</sup> European Congress of Immunology; PARIS, 6-9- September 2006) (POSTER).

**“Variazioni nel gene di perforina nei pazienti con autoimmunità/linfoproliferazione e difettiva funzionalità di Fas”.** Cerutti E., Cappellano G., Chiocchetti A., Clementi R., Ferretti M., Orilieri E, Dianzani I., Ferrarini M., Bregni M., Danesino C, Bozzi V., Putti M.C., Cometa A., Locatelli F., Maccario R., Ramenghi U., Dianzani U. (XXVIII Congresso Nazionale della Società italiana di Patologia, Università degli studi di Pavia, 19-22 settembre 2006). (COMUNICAZIONE ORALE)

**“Search for genetic alterations of the Fas system in the autoimmune/lymphoproliferative syndrome (ALPS)”.** Dianzani U., Chiocchetti A., Cappellano G., Orilieri E., Cerutti E., Ferretti M., Clementi R., Notarangelo L., Ramenghi U. (XIV Telethon Convention, Palazzo dei Congressi, Salsomaggiore Terme, 12-14 Marzo, 2007). (POSTER).

## 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* 108(9):3079-84, 2006.

Castelli L, Comi C, Chiocchetti A, Nicola S, Mesturini R, Giordano M, D'Alfonso S, Cerutti E, Galimberti D, Fenoglio C, Tesser F, Yagi J, Rojo JM, Perla F, Leone M, Scarpini E, Monaco F, Dianzani U. **ICOS gene haplotypes correlate with IL10 secretion and multiple sclerosis evolution.** *J Neuroimmunol.* 186(1-2):193-8, 2007.